

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Eliška Brabencová**

**Studium interakce vybraných chemopreventivních sloučenin  
a potravních karcinogenů s cytochromy P450**

**Study on the interaction of chemopreventive compounds and food born  
carcinogens with cytochrome P450 enzymes**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5. 2013

.....  
podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady, ochotu a čas, který mi při vypracování diplomové práce věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michaelle Moserové, Ph.D. a RNDr. Kateřině Levové za cenné rady a pomoc při experimentální práci.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantu GAČR P303/12/G163.

## Abstrakt

V poslední době se rozšířilo užívání přírodních chemopreventivních sloučenin ve formě potravních doplňků. Mezi velmi populární chemopreventivní sloučeniny patří flavonoidy. Díky jejich přírodnímu původu jsou obecně považovány za bezpečné látky. Mají antioxidační, protirakovinné a protizánětlivé účinky. Na flavonoidy však musí být nahlíženo i jako na látky cizorodé (xenobiotika). Flavonoidy interagují s řadou enzymů, mezi nejdůležitější z nich patří cytochromy P450 (CYP), klíčové enzymy I. fáze biotransformace, které metabolizují xenobiotika (např. léčiva a karcinogeny). Přestože CYP katalyzují především reakce vedoucí k detoxikaci xenobiotik, některé CYP se významně podílí i na aktivaci karcinogenů. Například heterocyklické aminy jsou aktivovány CYP1A1 a CYP1A2. Flavonoidy prostřednictvím indukce CYP nebo stimulace jejich aktivity mohou zvýšit aktivaci karcinogenů a tím i riziko vzniku rakoviny.

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem vybraných flavonoidních sloučenin a potravních karcinogenů na indukci a aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 v játrech a tenkém střevě potkanů. Pro účely této studie bylo tenké střevo rozděleno na tři části: proximální (nejblíže žaludku), střední a distální část. Indukce CYP byla vyhodnocena pomocí metody „Western blotting“, pro stanovení aktivity CYP1A1 a CYP1A2 byly použity jejich specifické substráty 7-ethoxyresorufin a 7-methoxyresorufin.

Flavonoidní sloučeniny (podané p.o.) myricetin, dihydromyricetin a směsný přípravek Antistax obsahující flavonoidy neovlivnily významně indukci ani aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 v játrech ani tenkém střevě potkanů.

Dále byl zkoumán vliv sekvenčního p.o. podání modelové chemopreventivní sloučeniny  $\beta$ -naftoflavonu (induktor podrodiny CYP1A) a karcinogenu PhIP. Obě sloučeniny byly podány potkanům též samostatně. V játrech způsobil PhIP podaný 72 h po  $\beta$ -naftoflavonu mírný pokles indukce i aktivity CYP1A1 ve srovnání se samotným  $\beta$ -naftoflavonem, naopak v tenkém střevě nebyl tento pokles pozorován. V tenkém střevě byla nejvyšší indukce i aktivita CYP1A1 po p.o. podání  $\beta$ -naftoflavonu i  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP pozorována v proximální části tenkého střeva a postupně klesala k distální části.

V této práci byl zkoumán též vliv i.p. podaného karcinogenu Sudanu I na indukci CYP1A1 v tenkém střevě. Sudan I indukoval CYP1A1 ve všech částech tenkého střeva.

**Klíčová slova:** cytochrom P450, flavonoidy, chemoprevence, karcinogeny,  
„Western blotting“

## Abstract

The use of food supplements containing natural chemopreventive compounds increased in recent years. Some of the most popular chemopreventive compounds are flavonoids. Due to their natural origin, flavonoids are generally accepted as safe compounds. They exert antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory properties. However, flavonoids should be considered as foreign compounds (xenobiotics). Flavonoids interact with many enzymes, among the most important belong cytochromes P450 (CYPs), key enzymes of the first phase of biotransformation of xenobiotics (e.g. drugs, carcinogens). CYPs catalyze reactions leading mainly to detoxification of xenobiotics. However, some CYPs are involved in the activation of carcinogens, particularly CYP1A1 and CYP1A2 activate e.g. heterocyclic amines. Flavonoids might enhance the activation of carcinogens via induction of these CYPs or stimulation of their activities and hence, increase the risk of a cancer development.

The thesis is focused on the influence of flavonoids and food carcinogens on the induction and activity of CYP1A1 and CYP1A2 in liver and small intestine of rats. For the purpose of this study, the small intestine was dissected into three parts: proximal (nearest to stomach), middle and distal. Western blotting was used for the evaluation of CYP induction. Activities of CYP1A1 and CYP1A2 were determined by using specific substrates 7-ethoxyresorufin and 7-methoxyresorufin, respectively.

Tested flavonoids (administered p.o.) myricetin, dihydromyricetin and food supplement Antistax containing flavonoids did not influence the induction and activity of CYP1A1 and CYP1A2 significantly neither in rat liver nor in the small intestine.

Next, the sequential p.o. exposure of animals to model chemopreventive compound  $\beta$ -naphthoflavone (known inducer of CYP1A family) and food carcinogen PhIP was carried out. Both compounds were administered also separately. In rat liver, the administration of PhIP 72 h after  $\beta$ -naphthoflavone caused slight decrease in the induction and activity of CYP1A1 in comparison with  $\beta$ -naphthoflavone administered separately. In small intestine, this decrease was not found. In the small intestine, the highest induction and activity of CYP1A1 after p.o. administration of  $\beta$ -naphthoflavone and  $\beta$ -naphthoflavone with PhIP was detected in the proximal part of the small intestine and decreased gradually towards the distal part.

In this thesis, the influence of i.p. administered carcinogen Sudan I on induction of CYP1A1 in rat small intestine was also examined. In all parts of the small intestine Sudan I induced CYP1A1 to the same extent.

(In Czech)

**Key words:** carcinogens, chemoprevention, cytochrome P450, flavonoids, Western blotting

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Cytochromy P450 .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450 .....	10
1.1.2 Struktura cytochromů P450 .....	11
1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450 .....	12
1.1.4 Indukce cytochromu P450 .....	14
1.1.5 Inhibice cytochromů P450 .....	15
1.1.6 Cytochromy P450 podrodiny 1A .....	15
<b>1.2 Biotransformace xenobiotik .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Karcinogeneze.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Chemické karcinogeny .....	19
1.3.1.1 Vybrané chemické karcinogeny.....	21
1.3.1.1.1 Heterocyklické aminy .....	21
1.3.1.1.2 Azobarvivo Sudan I .....	24
<b>1.4 Chemopreventivní sloučeniny .....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Flavonoidy .....	25
1.4.1.1 Flavonoidy a cytochromy P450 .....	27
1.4.1.2 Vybrané flavonoidní sloučeniny .....	28
<b>2 CÍL.....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Materiál a chemikálie .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Přístroje.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Metody .....</b>	<b>36</b>
3.3.1 Premedikace potkanů .....	36
3.3.2 Izolace mikrosomální frakce.....	37
3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů .....	38
3.3.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	39
3.3.5 Metoda „Western blotting” .....	41
3.3.6 Optimalizace metody „Western blotting” .....	42
3.3.7 Stanovení ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylační a methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylační aktivity .....	42
3.3.8 Stanovení obsahu cytochromu P450 .....	44
3.3.9 Stanovení specifického obsahu cytochromu P450 .....	45
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Izolace mikrosomální frakce a stanovení koncentrace proteinů.....</b>	<b>46</b>

<b>4.2</b>	<b>Optimalizace metody „Western blotting” .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Vliv zkoumaných látek na indukci cytochromu P450 .....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Vliv vybraných flavonoidních sloučenin na indukci CYP1A1 a 1A2 .....	49
4.3.2	Vliv sekvenčního podání chemopreventivní látky a karcinogenu na indukci CYP ...	51
4.3.3	Vliv Sudanu I na indukci cytochromu P450 v tenkém střevě .....	54
<b>4.4</b>	<b>Vliv zkoumaných látek na enzymovou aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 .....</b>	<b>55</b>
<b>4.5</b>	<b>Stanovení obsahu cytochromu P450 .....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>68</b>

## Seznam použitých zkratk

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor”)
Arnt	jaderný heterodimerizační partner Ah receptoru („Ah receptor-nuclear translocator”)
A $\alpha$ C	2-amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indol
BaP	benzo[a]pyren
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/ nitro blue tetrazolium
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
$\beta$ NF	$\beta$ -naftoflavon
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CAR	konstitutivní androstanový receptor („constitutive androstane receptor”)
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	7-ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylace
HA	heterocyklické aminy
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („International Agency for Research on Cancer”)
IgY	slepičí imunoglobulin typu Y
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]chinolin
MeIQ	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]chinoxalin
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases”)
MQ voda	deionizovaná voda z přístroje Simplicity 185, Millipore corp.
MROD	7-methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylace
NAD <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	isotonický roztok solí pufrovaný fosfátem



PhIP	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridin
PhIP-C8-dG	<i>N</i> -(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine
PPAR	receptor, který je aktivován proliferátorem peroxisomu („peroxisome proliferator receptor”)
PXR	pregnanový X receptor („pregnane X receptor”)
RH	substrát – obecný uhlovodík
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu
ROH	oxygenovaná forma substrátu
SDS	dodecylsulfát sodný
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzyzo- <i>p</i> -dioxin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

# 1 Úvod

## 1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.) představují rozsáhlou rodinu hemových proteinů, vyskytujících se u bakterií, živočichů, rostlin, hub i člověka [1]. Tyto enzymy se významně podílí na metabolismu cizorodých látek (např. léčiv, karcinogenů, polutantů), mají však i důležitou úlohu v metabolismu některých hydrofobních endogenních substrátů (prostaglandinů, sterolů, mastných kyselin) [2].

V lidském těle se cytochromy P450 vyskytují především v játrech, hlavním biotransformačním orgánu. Významné jsou i jejich hladiny v plicích, tenkém střevě, ledvinách, nadledvinkách, kůži a mozku. V buňkách jsou cytochromy P450 lokalizovány hlavně v membránách endoplazmatického retikula (mikrosomální typ), dále také v membránách mitochondrií (mitochondriální typ) [3].

Název cytochromů P450 je odvozen od jejich typické vlastnosti v redukovaném stavu v komplexu s CO poskytovat absorpční maximum při 450 nm (písmeno P značí pigment) [4]. Tímto se odlišují od ostatních hemoproteinů, které absorbují okolo 420 nm.

Cytochromy P450 jsou hlavními enzymy I. fáze biotransformace. Katalyzují reakce, kterými přeměňují cizorodé látky (xenobiotika) na méně toxické produkty. Může však docházet ke vzniku biologicky aktivnějších látek, a to jak z pozitivního hlediska (tvorba aktivní formy léčiv), tak z hlediska negativního – tvorba toxických, mutagenních či karcinogenních látek [3].

### 1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450

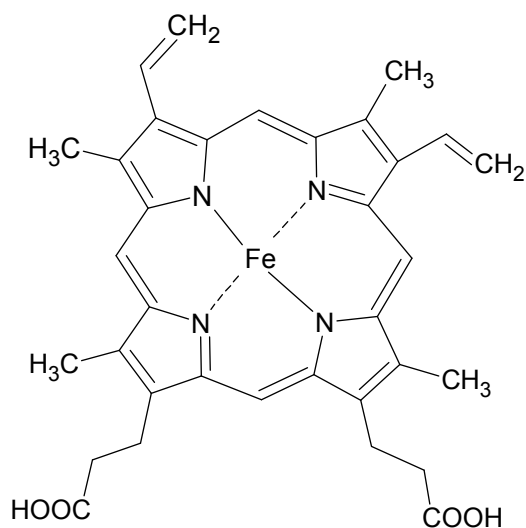
Podle současného systému klasifikace cytochromů P450 se tyto enzymy dělí na základě homologie aminokyselinové sekvence do genetických rodin a podrodin. Cytochromy P450 se označují zkratkou CYP, za ní následuje arabská číslice, která značí rodinu (např. CYP1). Následuje velké písmeno, které označuje příslušnou podrodinu (např. CYP1A). Konkrétní forma enzymu se značí arabskou číslicí za písmenem podrodiny (např. CYP1A1). CYP, které mají více než 40 % homologii aminokyselinové sekvence, náleží do stejné rodiny. Pokud je aminokyselinová sekvence identická z více než 55 %, patří tyto CYP do stejné podrodiny [1].

V současné době je známo 57 genů pro různé formy CYP v lidském genomu. Geny pro CYP jsou roztroušeny na všech lidských chromosomech kromě chromosomu Y [5].

Cytochromy P450 přítomné v lidském organismu se dělí do 18 rodin a 44 podrodin [6]. Na metabolismu xenobiotik participují však pouze 3 rodiny, a to CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře dále také CYP4). Ostatní rodiny CYP se účastní metabolismu endogenních substrátů (např. biosyntézy steroidů, cholesterolu, žlučových kyselin či metabolismu kyseliny arachidonové, mastných kyselin apod.) [5].

### 1.1.2 Struktura cytochromů P450

Eukaryotické cytochromy P450 jsou na rozdíl od prokaryotických membránově vázané hemoproteiny, které obsahují přibližně 500 aminokyselin. Cytochromy P450 se skládají z apoproteinu a prosthetické skupiny hemu b. Heme b (viz Obr. 1) je tvořen protoporfyrinem IX s centrálním atomem železa, který je vázán přes 4 atomy dusíku profyrinového kruhu.



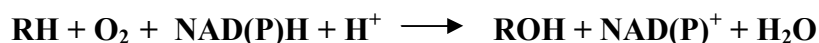
**Obr. 1:** Struktura hemu b

Porfyrinový skelet je částečně vázán hydrofobně a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která je přítomná v aktivním centru enzymu jako pátý ligand železa. Cytochromy P450 jsou tedy hemthiolátové proteiny. Tímto neobvyklým ligandem se odlišují CYP od ostatních hemoproteinů. Většina savčích hemoproteinů (hemoglobin, cytochrom b, peroxidasy) obsahuje jako 5. ligand atom dusíku z imidazolové skupiny histidinu. Šestým ligandem CYP je atom kyslíku molekuly vody [3,7]. Toto charakteristické uspořádání CYP způsobuje jednak jejich spektrální vlastnosti, které je odlišují od ostatních hemoproteinů (absorpční maximum při 450 nm), a také jim umožňuje aktivovat molekulární kyslík, což je klíčový krok reakčního mechanismu [7].

### 1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450

Cytochrom P450 je součástí mikrosomálního MFO systému (z anglického „mixed function oxidases”), tedy systému monooxygenas (oxidasy) se smíšenou funkcí, který je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula. Tento systém katalyzuje řadu oxidačních, oxygenačních, popř. i redukčních reakcí a využívá především molekulární kyslík [3]. Vedle CYP obsahuje MFO systém NADPH: cytochrom P450 reduktasu, která slouží jako dělič elektronového páru a postupně tak dodává elektrony cytochromu P450, který zde působí jako terminální oxidasa. Další složkou tohoto systému je biologická membrána, v níž jsou tyto enzymy zanořené. Fakultativně může MFO systém obsahovat cytochrom  $b_5$  a NADH: cytochrom  $b_5$  reduktasu [8].

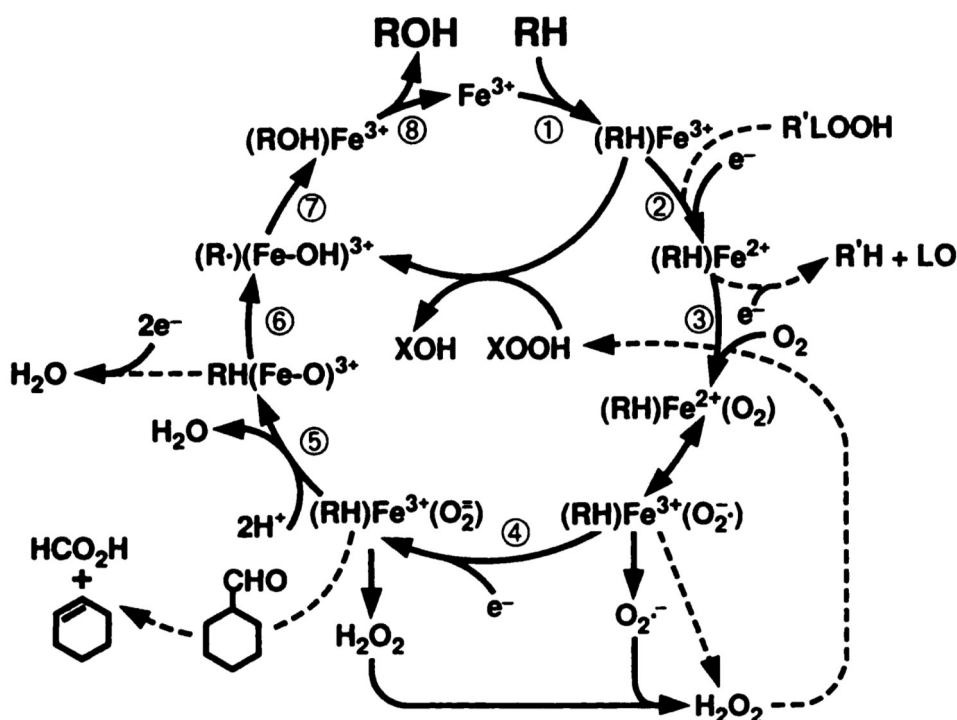
Typickou reakcí cytochromu P450 je reakce, při které dochází k aktivaci molekulárního kyslíku a následné inkorporaci jednoho atomu kyslíku do hydrofobního substrátu, druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Průběh této monooxygenasové reakce lze vyjádřit následující sumární rovnicí, kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt:



Reakční cyklus cytochromů P450 se pravděpodobně skládá nejméně z osmi kroků [9] a je znázorněn na Obr. 2, str. 13. V klidovém stavu je centrální ion železa CYP ve ferri formě (oxidační číslo III+) a je hexakoordinovaný (nízkospinový stav), šestým ligandem je kyslík vody. V prvním kroku dochází k vazbě substrátu na ferri formu CYP, šestý ligand je vytlačen, centrální ion železa zůstává pentakoordinován, zároveň se mění konformace molekuly enzymu. Poté dochází k přenosu jednoho elektronu z NADPH: cytochrom P450 reduktasy na CYP a centrální ion železa je tak redukován na  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro forma) (reakce 2). Tato forma enzymu je schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (např. CO). Navázáním molekulárního kyslíku vzniká ternární komplex cytochrom P450- $\text{O}_2$ -substrát, centrální ion železa je opět hexakoordinován (reakce 3). Ternární komplex přechází do druhého mezomerního stavu, na tzv. ferri-superoxidový komplex. Ten je v dalším kroku redukován druhým elektronem z NADPH:cytochrom P450 reduktasy (nebo cytochromem  $b_5$ ), za vzniku ferro-superoxidového komplexu (reakce 4). Komplex CYP s biatomickou molekulou kyslíku po druhé reakci je zcela aktivovanou formou cytochromu P450. Následuje krok, ve kterém je biatomická molekula kyslíku štěpena, přičemž jeden atom kyslíku je redukován přijetím dvou protonů a vzniká voda, druhý zůstává navázaný

na centrálním iontu železa v hemu, a to ve formě ferrioxenového komplexu (reakce 5). Následuje odštěpení atomu vodíku z molekuly substrátu, vzniká tak radikál substrátu a hydroxylový radikál vázaný na centrální ion železa (reakce 6). Rekombinací radikálů vzniká hydroxylovaná molekula substrátu, která je z enzymu uvolněna, a nativní forma cytochromu P450 (reakce 8) [8–10].

Vedle molekuly kyslíku může cytochrom P450 využít pro oxidační reakce peroxidy a peroxikyseliny, které se tak stávají donorem již aktivovaného atomu kyslíku. Tato reakce se označuje jako peroxidasová aktivita CYP. Tato reakce probíhá neuspořádaným mechanismem, vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. Účinnost oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou CYP je obvykle nižší než reakce v přítomnosti NADPH a  $O_2$  (hlavně z důvodu značné destrukce samotného enzymu) [8].



**Obr. 2:** Reakční cyklus cytochromu P450 (převzato z [10])

RH- substrát, ROH- monooxygenační produkt, R'LOOH – lipidický hydroperoxid, R'H a LO- redukční produkty hydroperoxidu, XOOH- peroxisloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu

#### 1.1.4 Indukce cytochromu P450

Zastoupení cytochromů P450 v lidských tkáních je závislé na mnoha faktorech, jako jsou např. genetický polymorfismus, stáří, pohlaví a vnější podmínky (environmentální polutanty, výživa, kouření, konzumace alkoholu, podaná léčiva) [3].

Organismus je neustále vystaven působení různých xenobiotik. Jak již bylo uvedeno, cytochromy P450 se významně podílí na metabolismu hydrofobních xenobiotik, přeměňují je na látky polárnější, které mohou být z organismu snadněji vyloučeny. Vystavení organismu cizorodému substrátu má často za následek zvýšenou expresi příslušných CYP, které jsou schopny tento substrát metabolizovat. Tato adaptivní odpověď se nazývá indukce. Je to přísně regulovaný proces kontrolovaný primárně na úrovni transkripce [11].

Z hlediska indukce se označují CYP jako konstitutivní, pokud je jejich obsah v organismu stabilní, a inducibilní CYP, jejichž obsah je závislý na přítomnosti induktoru. Hlavním mechanismem indukce CYP je zvýšení hladiny transkripce. Indukce CYP je zprostředkována těmito intracelulárními receptory:

- AhR („aryl hydrocarbon receptor“)
- CAR („constitutive androstane receptor“)
- PXR („pregnane X receptor“)
- PPAR („peroxisome proliferator receptor“)

AhR reguluje expresi genů rodiny CYP1, prostřednictvím AhR dochází k indukci enzymů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 [12]. AhR je cytosolární receptor, k jehož aktivaci dochází v přítomnosti induktorů, mezi které patří např. polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren), TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzylo-*p*-dioxin) a polychlorované dibenzofurany [11]. Po navázání ligandu na AhR dojde k jeho aktivaci a přesunutí do jádra, kde vytvoří heterodimer s jaderným faktorem Arnt („Ah receptor-nuclear translocator“). Tento komplex se následně váže na specifickou sekvenci DNA a stimuluje tak transkripci příslušných genů [13].

CAR a PXR jsou jaderné receptory, které ovlivňují především regulaci enzymů podrodiny CYP2B, CYP2C a CYP3A, jaderný receptor PPAR pak regulaci enzymů podrodiny CYP4A. Tyto jaderné receptory jsou aktivovány navázáním ligandu. Poté tvoří heterodimer s dalším jaderným receptorem – retinoidním X receptorem. Následuje vazba

heterodimeru na odpovídající tzv. rozpoznávací element genu, který kóduje daný CYP [14].

### **1.1.5 Inhibice cytochromů P450**

Sloučeniny, které snižují katalytickou aktivitu enzymů se označují jako inhibitory. V katalytickém cyklu cytochromů P450 jsou k inhibici náchylné zejména tyto tři kroky: vazba substrátu na enzym (1. reakce), vazba molekulárního kyslíku, po které následuje první přenos elektronu (3. reakce), a krok, ve kterém je substrát oxidován. Inhibitory cytochromů P450 mohou být rozděleny do tří skupin:

- reverzibilně vázané inhibitory
- inhibitory, které vytváří „kvazi“-ireverzibilní komplex s centrálním atomem železa (tyto inhibitory jsou přeměněny CYP na intermediáty, které se vážou pevně na hemové železo, mohou být odstraněny jen za zvláštních podmínek)
- inhibitory, které se vážou ireverzibilně (kovalentně) na hem či protein nebo urychlují degradaci a oxidační rozpad hemové prosthetické skupiny [15]

Inhibitory, které působí před vlastním oxidačním krokem jsou převážně reverzibilní kompetitivní (inhibitor soutěží se substrátem o vazebné místo enzymu) či nekompetitivní inhibitory. Naopak ty, které působí během nebo po oxidačním kroku (při přenosu kyslíku) jsou obecně ireverzibilní nebo kvazi-ireverzibilní inhibitory [15].

### **1.1.6 Cytochromy P450 podrodiny 1A**

Podrodina CYP1A se skládá z enzymů CYP1A1 a 1A2. Tyto CYP jsou nejvýznamnější z hlediska jejich úlohy při aktivaci prokarcinogenů, mohou aktivovat až 90 % všech známých karcinogenů [3]. Podílí se např. na aktivaci polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických aminů a aromatických aminů. Oba enzymy jsou inducibilní (přes AhR, jak již bylo uvedeno), mají velmi podobnou strukturu (vykazují až 70 % homologii aminokyselinové sekvence) a katalyzují stejné či podobné reakce [3]. Liší se však v lokalizaci. Zatímco lidský CYP1A2 se vyskytuje v játrech, CYP1A1 je extrahepatální enzym, který je u lidí přítomný např. v plicích, gastrointestinálním traktu,

mozku a srdci [3,12]. V játrech byl též prokázán výskyt lidského CYP1A1, je zde však zastoupen pouze v nízkých koncentracích [16]. Výskyt CYP1A1 a CYP1A2 u lidí a potkanů je trochu odlišný. Porovnání pravděpodobného výskytu těchto CYP u lidí a potkanů je znázorněno v Tab. 1. Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP1A1 a 1A2 je uveden v Tab. 2.

**Tab. 1:** Porovnání výskytu CYP1A1 a CYP1A2 u lidí a potkanů [16–19]

	potkan		člověk	
	výskyt	inducibilita	výskyt	inducibilita
<b>CYP1A1</b>	všechny tkáně	inducibilní	extrahepatální tkáně, játra*	inducibilní
<b>CYP1A2</b>	játra	konstitutivní	játra	inducibilní
	všechny tkáně	inducibilní		

\* Starší literatura [17,18] uvádí výskyt CYP1A1 u lidí v extrahepatálních tkání, novější studie prokázaly přítomnost lidského CYP1A1 i v játrech [16,19].

**Tab. 2:** Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů enzymů CYP1A1 a CYP1A2 [3,12,20]

enzym	substrát	induktor	inhibitor
<b>CYP1A1</b>	benzo[a]pyren a jiné PAH aflatoxin B1 PhIP	TCDD β-naftoflavon benzo[a]pyren kouření dioxiny	retinol α-naftoflavon ellipticin
<b>CYP1A2</b>	benzo[a]pyren aflatoxin B1 heterocyklické a aromatické aminy např. PhIP	TCDD β-naftoflavon benzo[a]pyren polychlorované bifenyly	α-naftoflavon apigenin isosafrol

PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky

PhIP - 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin;

TCDD - 2,2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin



## 1.2 Biotransformace xenobiotik

S rozvojem všestranných technologických pokroků se do životního prostředí začaly dostávat cizorodé látky – xenobiotika (*xenos* – cizí), se kterými se organismy dříve neselekaly. Jedná se o sloučeniny, které jsou cíleně produkované a využívány v průmyslu nebo zemědělství [9]. Mezi xenobiotika patří i různé toxikanty, karcinogeny, léčiva, potravinářská aditiva apod. Jsou to látky, které mohou být pro organismy škodlivé, proto se je organismy snaží odbourat.

Procesy, které by měly vést k snadnému vyloučení xenobiotik nebo potlačení jejich negativního působení v organismu, se označují jako biotransformace a exkrece xenobiotik [9]. Rozlišujeme dvě hlavní fáze biotransformace:

- **I. fáze biotransformace – derivatizační**
- **II. fáze biotransformace – konjugační.**

V první fázi biotransformace (derivatizační fáze) dochází k zabudování polárních skupin do struktury hydrofobního xenobiotika nebo k demaskování (odkrytí) již přítomných polárních skupin v molekule xenobiotika. Většina reakcí I. fáze biotransformace probíhá oxidačně (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace atd.). Dále probíhají i redukční reakce (nitroredukce, azoredukce) nebo reakce hydrolytické, při kterých dochází k demaskování polárních skupin (hydrolyza esterů, amidů) [9,21]. Těmito reakcemi se zvýší polarita xenobiotika, které může dále vstoupit do II. fáze biotransformace. Je-li xenobiotikum po I. fázi biotransformace dostatečně polární, může být z těla vyloučeno přímo. Hlavními enzymy, které se účastní I. fáze biotransformace jsou např. cytochormy P450, flavinové monooxygenasy, peroxidasy, aldehyddehydrogenasa či alkoholdehydrogenasa [22].

V druhé fázi biotransformace (konjugační fáze) dochází ke konjugačním reakcím xenobiotik s endogenními sloučeninami. Endogenní sloučeniny (např. glukuronát, sulfát z aktivního sulfátu, glutathion, cystein, glycin) se váží na funkční skupiny zavedené do molekuly xenobiotika během I. fáze biotransformace. Reakcemi II. fáze biotransformace dochází k dalšímu zvýšení polarity molekuly původně hydrofobní povahy a k usnadnění eliminace xenobiotika z buněk a exkrece z organismu močí a výkaly [9]. Většina konjugačních reakcí je katalyzována enzymy ze třídy transferas: UDP-glukuronosyltransferasa, sulfotransferasa, N-acetyltransferasa, glutathion-S-transferasa apod. [22].

Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra, dalšími orgány participujícími na biotransformaci jsou ledviny, plíce a gastrointestinální trakt. Enzymové systémy podílející se na metabolismu xenobiotik jsou lokalizovány většinou v membráně endoplazmatického retikula nebo v cytosolu [21].

Během biotransformace xenobiotik dochází většinou ke zvýšení jejich polaritu, jak již bylo uvedeno. Produkty těchto reakcí však nemusí být jen netoxické metabolity. V průběhu biotransformace může docházet jak k detoxikačním reakcím, které vedou ke snížení toxicity sloučenin, tak k aktivaci xenobiotik, při které vznikají látky ještě více toxické než původní molekuly. Jedná se zejména o metabolickou aktivaci prokarcinogenů na karcinogenní produkty. V průběhu I. i II. fáze biotransformace mohou vznikat reaktivní elektrofilní intermediáty, které se mohou vázat na DNA, RNA či proteiny, a iniciovat tak karcinogenní procesy [21]. Detoxikační i aktivační procesy od sebe často nelze oddělit. Tentýž enzym se může podílet na detoxikaci jedné látky a zároveň zvyšovat toxicitu jiné látky [5].

### **1.3 Karcinogeneze**

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí lidí v celosvětovém měřítku. Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, přičemž vnější faktory značně převažují. Ze všech případů rakoviny je 90-95% způsobeno vnějšími faktory jako jsou environmentální vlivy a životní styl (konzumace alkoholu, strava, kouření). Pouhých 5-10 % případů rakoviny je způsobeno genetickými poruchami [23]. Karcinogeneze (nebo též kancerogeneze) je mnohastupňový proces, při kterém dochází k nahromadění poruch v genetickém materiálu buněk (mutací apod.), které má za následek porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů a enzymů podílejících se zejména na regulaci dělení a diferenciaci buněk [24].

V procesu karcinogeneze jsou významné poruchy jen malého počtu genů. Nejzávažnější jsou mutace v genech, které jsou klíčové pro regulaci buněčných procesů jako je buněčné dělení, diferenciace a apoptóza [24]. Mezi tyto geny patří protoonkogeny a tumor-supresorové geny. Protoonkogeny kódují proteiny podílející se funkčně na regulaci dělení a diferenciaci buněk. Jejich přítomnost v buňce je jednou z hlavních podmínek normálního růstu, dělení a diferenciaci buňky. Tumor-supresorové geny (neboli antionkogeny) jsou geny, jejichž produkty potlačují proliferaci somatických buněk, udržují

buňku ve stadiu klidu ( $G_0$  fáze), a chrání tak buňku před nádorovou transformací [25]. V důsledku mutace v protoonkogenech a tumor-supresorových genech může dojít k nekontrolovatelnému dělení buněk a následné maligní transformaci buněk [5].

Proces karcinogeneze se skládá ze tří fází: iniciační, promoční a propagační.

- **Iniciační fáze**

V iniciační fázi dochází ke změně genetické informace buněk. Pokud dojde k mutaci v protoonkogenech a tumor-supresorových genech a tato porucha není opravena reparačními enzymy, z normální buňky vzniká buňka iniciovaná. V případě, že iniciovanou buňku nezničí ani imunitní systém, může se v dalších fázích vyvinout až v nádor [5].

- **Propagační fáze**

V této fázi, která může trvat až několik let, dochází ke zvýšené proliferaci iniciovaných buněk. Po expozici iniciovaných buněk faktorům s promočním účinkem, se jejich genetická informace ještě více poškodí a dojde k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací [5]. V důsledku toho vzniká benigní (nezhoubný) nádor.

- **Progresní fáze**

Progresní fáze je poslední fází procesu karcinogeneze. Lze ji přirovnat k iniciační fázi, ovšem procesy modifikace DNA jsou v progresní fázi ještě razantnější [3]. Působením progresoru se mění doposud částečně kontrolovatelný růst benigního nádoru v nekontrolovatelný, vzniká nádor maligní (zhoubný), který infiltruje i do sousedních tkání [5].

### 1.3.1 Chemické karcinogeny

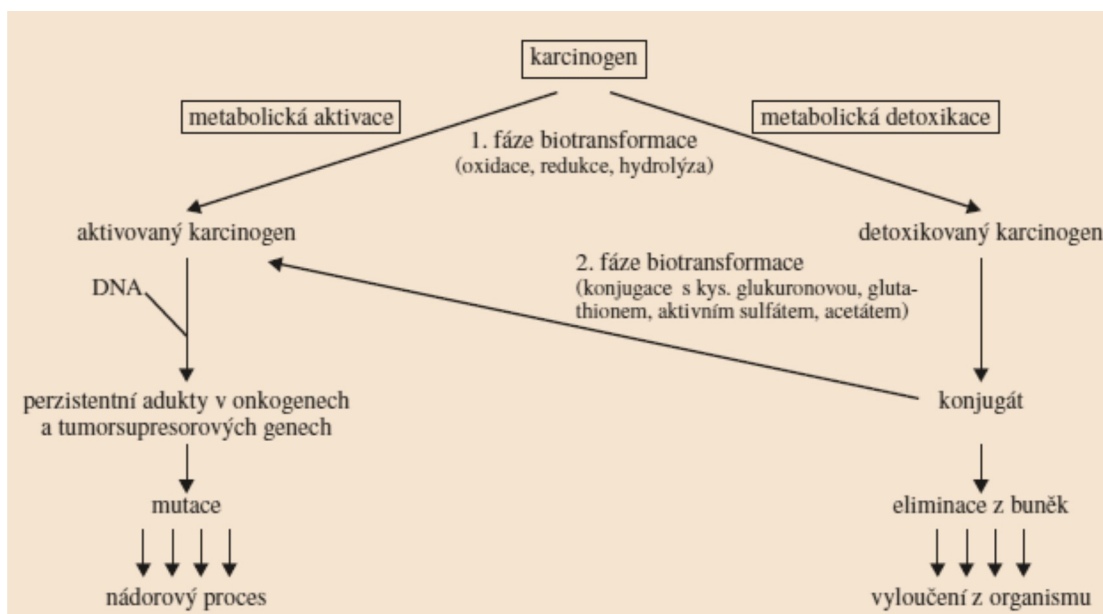
Jak již bylo uvedeno, při vzniku nádorových onemocnění se uplatňují vnitřní i vnější faktory. Vnější faktory můžeme dále dělit na faktory fyzikální (např. UV- záření, rentgenové záření), biologické (onkogenní viry, infekční mikroorganismy) a chemické (chemické karcinogeny). Právě chemické karcinogeny jsou z hlediska karcinogeneze považovány za nejdůležitější vnější faktory, v etiologii nádorových onemocnění hrají významnou úlohu.

Chemické karcinogeny se do lidského organismu dostávají z životního prostředí, jako součásti potravy nebo jako léčiva apod. Chemické karcinogeny lze podle mechanismu jejich působení rozdělit do dvou základních skupin:

- **genotoxické karcinogeny:** váží se na DNA kovalentní vazbou a vytváří tak kovalentní adukty
- **epigenetické karcinogeny:** modifikují DNA nekovalentně [26].

Mezi genotoxické karcinogeny patří např. některé heterocyklické aminy (2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridin neboli PhIP), polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[a]pyren) či mykotoxiny (aflatoxin B<sub>1</sub>) [27]. Mezi epigenetické karcinogeny patří např. látky označované jako interkalátory, které se vmezeřují do dvoušroubovicové struktury DNA [5].

Z hlediska karcinogeneze je za nejzávažnější modifikace DNA považována tvorba kovalentních aduktů. Většina chemických karcinogenů pro to, aby mohla tvořit adukty s DNA, vyžaduje nejprve metabolickou aktivaci (není tedy aktivní ve své původní formě) [26]. Z tzv. prokarcinogenních forem jsou přeměňovány na reaktivní elektrofilní formy, které tvoří adukty s DNA. K aktivaci prokarcinogenů dochází během I. fáze biotransformace především prostřednictvím cytochromů P450 [3]. Ačkoli jsou reakce II. fáze především detoxikační, i zde může dojít k aktivačním reakcím – např. při konjugaci některých karcinogenů se sulfátem nebo acetátem [26]. Většina kovalentních aduktů je z DNA eliminována reparačními mechanismy. Pokud ovšem nedojde k jejich odstranění, některé perzistentní adukty způsobují permanentní mutace v důležitých genech kontrolujících růst a diferenciaci buněk (protoonkogenech a tumor-supresorových genech), v jejichž důsledku dochází k vyvolání nádorového procesu [26]. Schematické znázornění mechanismu působení chemických karcinogenů je uvedené na Obr. 3, str. 21.

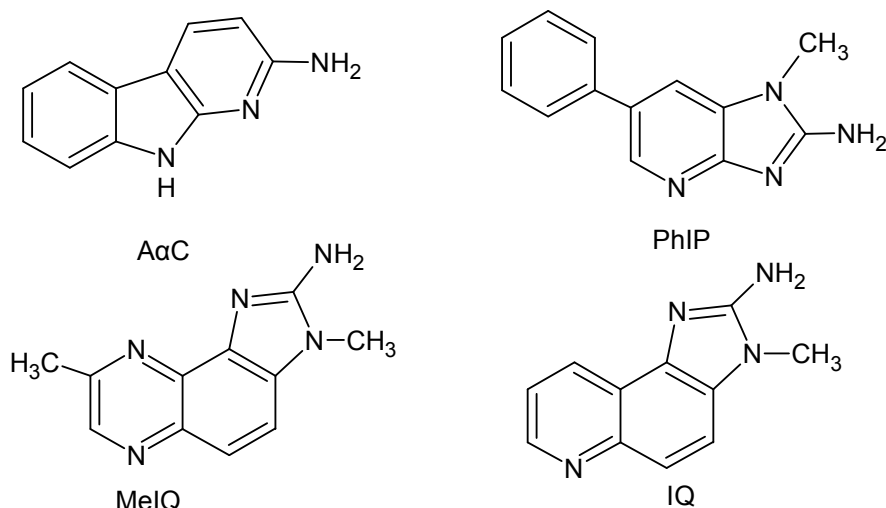


**Obr. 3:** Mechanismus působení chemických karcinogenů, převzato z [26]

### 1.3.1.1 Vybrané chemické karcinogeny

#### 1.3.1.1.1 Heterocyklické aminy

Heterocyklické aminy (HA) jsou skupinou látek s mutagenními a karcinogenními účinky. Vznikají při tepelné úpravě masa a to během pyrolýzy aminokyselin, proteinů a kreatinu [28]. Produkované sloučeniny obsahují ve své struktuře několik heterocyklických aromatických kruhů s exocyklickou aminoskupinou, která je nezbytná pro metabolickou aktivaci a karcinogenitu HA [29]. HA poškozují DNA tvorbou kovalentních aduktů. Mezi nejvýznamnější HA aminy, které se nejvíc vyskytují v potravě, patří AαC (2-amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indol), MeIQ (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinoxalin, IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin) a PhIP (2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin), jejich struktura je znázorněna na Obr. 4, str. 22.



**Obr. 4:** Struktura nejčastěji se vyskytující heterocyklických aminů (upraveno podle AαC - 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indol, MelQ - 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin, IQ - 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin, PhIP 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin

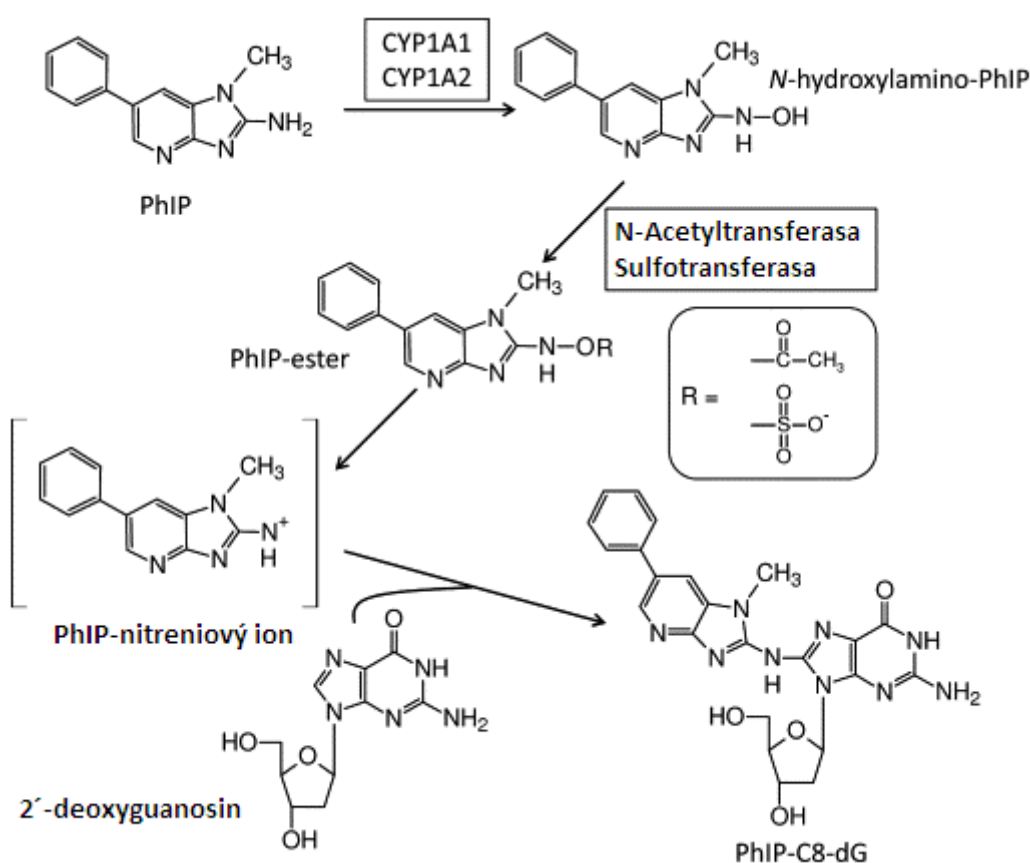
Heterocyklické aminy se vytváří při tepelné úpravě masa (hovězího, vepřového, kuřecího i ryb). Jsou však přítomny i v cigaretovém kouři, proto je u kuřáků zvýšen jejich příjem. Množství vznikajících HA je úměrné výši teploty a době jejího působení na potravinu. Nejvíce HA vzniká při grilování, smažení, méně při pečení. Při dušení či vaření masa vzniká jen zanedbatelné množství HA. Pro snížení příjmu těchto látek je vhodné omezit úpravu masa při teplotách vyšších než 100 °C a při teplotách přesahujících tuto hodnotu je zpracovávat jen krátce [30,31].

## 2-Amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)

PhIP je jedním z nejčastěji se vyskytujících HA v potravě. Studie prokázaly, že tento HA způsobuje nádory tlustého střeva, mléčné žlázy a prostaty u potkanů [32,33]. PhIP je tak považován za možný rizikový faktor rakoviny u lidí. Podle IARC („International Agency for Research on Cancer”), která shromažďuje informace o karcinogenních látkách, je PhIP klasifikován jako karcinogen skupiny 2 B („possibly carcinogenic to humans”), tedy možná karcinogenní pro lidi [34].

Genotoxicita PhIP souvisí s metabolickou aktivací PhIP na reaktivní elektrofilní intermediát, který může tvořit kovalentní adukty s DNA. Schéma metabolické aktivace PhIP je znázorněno na Obr. 5, str. 23. Nejprve dochází k oxidaci exocyklické

aminoskupiny za vzniku N-hydroxyderivátu PhIP, a to především prostřednictvím jaterního enzymu CYP1A2 a dále též extrahepatálním enzymem CYP1A1 [35]. Vzniklý N-hydroxyderivát PhIP je dále přeměněn N-acetyltransferasou nebo sulfottransferasou na reaktivní ester, který je nestabilní a heterolytickým štěpením z něj vzniká nitreniový ion. Tento nitreniový ion PhIP je ultimální karcinogen schopný tvořit adukt s DNA [28,36]. Hlavním vznikajícím aduktem je u lidí i potkanů *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP-C8-dG) [37].



**Obr. 5:** Metabolická aktivace PhIP, převzato z [38]

PhIP -2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine,

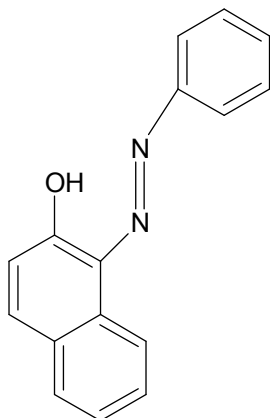
PhIP-C8-dG- *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

Vedle popsané metabolické aktivace PhIP dochází též k detoxikačním reakcím: N-hydroxylamino-PhIP vzniklý v iniciační oxidační reakci může být detoxikován UDP-glukuronosyltransferasou za vzniku příslušného glukuronidu. Reaktivní PhIP-ester může být též detoxikován a to enzymem glutathion-S-transferasou, který katalyzuje konjugací reakci s glutathionem [29].

#### 1.3.1.1.2 Azobarvivo Sudan I

Sudan I (známý též pod názvem I.C. Solvent Yellow 14) neboli 1-fenylazo-2-hydroxynaftol patří mezi azobarviva, která obsahují ve své struktuře funkční azoskupinu. Struktura Sudanu I je znázorněna na Obr. 6. Dříve byl hojně používán jako potravinové barvivo. Bylo však zjištěno, že způsobuje nádory jater a močového měchýře u potkanů, myši a králíků [39]. Sudan I je považován za možný karcinogen i pro lidi. Kromě karcinogenních účinků byly prokázány alergenní účinky, Sudan I způsobuje kontaktní dermatitidu [40]. I přes své negativní účinky je Sudan nadále používán pro barvení různých materiálů jako jsou oleje, tuky, plasty nebo je přidáván do tiskařských barev či leštidel na podlahu a do krémů na boty [39].

Sudan I je metabolizován především v játrech oxidačními a redukčními reakcemi. Na jeho metabolismu se podílí jak cytochromy P450, tak peroxidasy [39]. Sudan I je typický prokarcinogen, který vyžaduje metabolickou aktivaci. Enzym CYP1A1 participuje jak na jeho detoxikaci, tak na jeho metabolické aktivaci na benzendiazoniový ion, který se může navázat na DNA a vytvářet tak kovalentní adukty [16].



**Obr. 6:** Struktura Sudanu I



## 1.4 Chemopreventivní sloučeniny

Rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí lidí na celém světě. Proto se v současné době vyvíjí mnoho úsilí na prevenci, diagnostiku a léčbu rakoviny. Jeden z hlavních přístupů, jak snížit riziko vzniku rakoviny, je právě prevence. Chemoprevence je definovaná jako užívání chemických sloučenin za účelem snížení rizika vzniku rakoviny. Chemopreventivní sloučeniny mohou být ve formě léčiva, potravinového doplňku nebo součástí stravy [41].

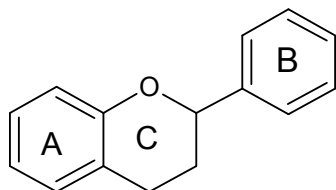
Epidemiologické studie prokázaly možnou souvislost mezi snížením rizika vzniku rakoviny a konzumací určitého druhu ovoce a zeleniny. Navíc bylo zjištěno, že strava s bohatým obsahem vlákniny souvisí se snížením výskytu rakoviny, zejména pak rakoviny tlustého střeva [42]. Chemopreventivní potenciál fytochemikálií spočívá v kombinaci jejich antioxidačních, protizánětlivých účinků, dále jejich schopnosti podporovat imunitu apod. [43]. Mezi možné chemopreventivní sloučeniny lze řadit karotenoidy, vitaminy (A, C, E), flavonoidní a fenolické sloučeniny, organické sloučeniny síry, isothiokyanáty, kurkuminy či mastné kyseliny apod. [44].

Fytochemikálie patří mezi velmi populární chemopreventivní sloučeniny, zejména proto, že jsou přírodního původu. Obecně jsou tyto látky považovány za bezpečné, a proto v posledních letech výrazně vzrostla jejich konzumace ve formě potravních doplňků. Nicméně nadměrný příjem takových sloučenin může být pro člověka škodlivý. Správně na ně musí být nahlíženo jako na látky tělu cizí. Vedle pozitivních účinků mohou chemopreventivní látky působit i negativně, např. mohou být přeměňovány na cytotoxické, prooxidační či mutagenní látky, mohou interferovat s endogenními sloučeninami nebo indukovat enzymy, které aktivují karcinogeny apod. [43].

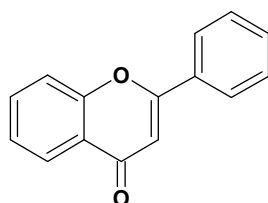
### 1.4.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou chemopreventivní sloučeniny s fenolickou strukturou, které jsou obsaženy v ovoci a zelenině. Vyskytují se např. v citrusech, meruňkách, třešních, borůvkách, černém rybízu, hroznovém víně, cibuli, paprice, brokolici, rajčatech, špenátu či v sójových bobech. Jsou obsaženy též v nápojích - čaji, kávě a vínu [2]. Flavonoidy patří mezi rostlinné sekundární metabolity, které hrají významnou roli při růstu a vývoji rostlin, ochraňují je před mikroorganismy. Látky flavonoidní struktury patří též mezi rostlinné pigmenty a vůně [2].

Základem struktury flavonoidů je heterocyklická sloučenina flavan (struktura C6-C3-C6), který se skládá z tří cyklů A, B a C a je znázorněn na Obr. 7. Podle struktury se flavonoidy dělí na flavany, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, anthokyaniny a katechiny (flavanoly) [45]. Jejich struktura, zástupci a hlavní výskyt je shrnut na Obr. 8. Přirozeně se flavonoidy vyskytují většinou jako glykosidy (např. glukosidy, rhamnoglukosidy, rutinosidy).

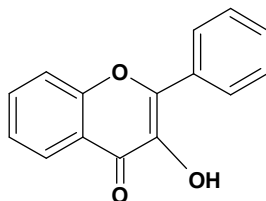


**Obr. 7:** Struktura flavanu



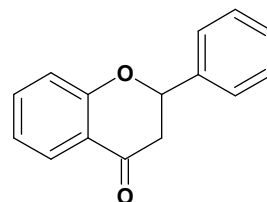
**flavon**

- **apigenin, luteolin**  
- petržel, celer, tymián,  
sladká paprika



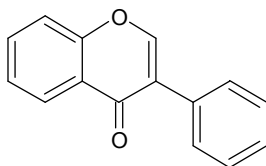
**flavonol**

- **quercetin, myricetin, kaempferol**  
- cibule, brokolice, třešně, borůvky,  
rybíz, šťovík, fenykl, čaj



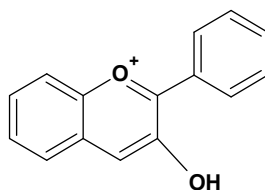
**flavanon**

- **naringenin, hesperidin**  
citrusy, slívy



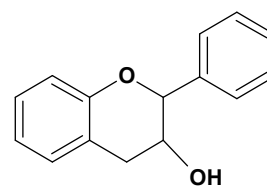
**isoflavon**

- **genistein, daidzein**  
- sójové boby, luštěniny



**anthokyanidin**

- **pelargonidin, malvidin**  
- třešně, hroznové víno



**katechin (flavanol)**

- **epikatechin, gallokatechin**  
- jablka, kakao, čaj

**Obr. 8:** Struktura jednotlivých skupin flavonoidů, jejich zástupci a výskyt [2,45]

Většina flavonoidů se vyskytuje ve formě beta-glykosidů, aby byly vstřebatelné, musí dojít k odštěpení sacharidové složky. Metabolismus flavonoidů začíná ve tlustém střevě, kde dochází k jejich štěpení na aglykony (volné flavonoidy). Střevní mikroflora dále štěpí flavonoidy na fenolické kyseliny. Dalším místem metabolismu jsou játra [2].

Flavonoidy vykazují mnoho pozitivních účinků. Jsou to účinné antioxidanty, vychytávají reaktivní intermediáty (např. hydroxylové radikály), mají protizánětlivé a antibakteriální účinky. Některé flavonoidy jsou též schopné chelatovat bivalentní kationty kovů (Fe, Cu). Díky těmto vlastnostem jsou považovány za chemopreventivní látky. Flavonoidy snižují výskyt kardiovaskulárních onemocnění, onemocnění jater a také některých druhů rakoviny. Vedle těchto pozitivních účinků však byly zjištěny i negativní účinky flavonoidů. Některé flavonoidy mohou mít mutagenní nebo prooxidační účinky [2].

#### **1.4.1.1 Flavonoidy a cytochromy P450**

Vedle již jmenovaných nespecifických účinků flavonoidů, působí tyto látky specificky na řadu enzymů, mezi něž patří cytochromy P450. Jak již bylo uvedeno (viz kapitola 1.1), cytochromy P450 jsou enzymy I. fáze biotransformace, které hrají, mimo jiné, významnou roli v metabolismu xenobiotik (karcinogenů, léčiv, polutantů). Ovlivnění aktivity těchto enzymů může tedy významně ovlivnit i metabolismus xenobiotik. Cytochromy P450 jsou zapojeny do interakce s flavonoidy nejméně na těchto třech úrovních [2]:

- flavonoidy indukují biosyntézu některých CYP
- flavonoidy ovlivňují enzymovou aktivitu CYP (inhibují/ stimulují)
- některé CYP metabolizují flavonoidy

Některé cytochromy P450, obzvláště pak CYP1A1 a 1A2, se vedle detoxikačních reakcí významně podílí na aktivaci prokarcinogenů [3]. Flavonoidy mohou prostřednictvím indukce těchto CYP nebo stimulace jejich aktivity zvýšit aktivaci karcinogenů. Na druhé straně inhibicí CYP, které se podílí na aktivaci karcinogenů, působí na organismus pozitivně. Flavonoidy působí chemopreventivně též vychytáváním reaktivních intermediátů vzniklých při aktivaci karcinogenů [2].

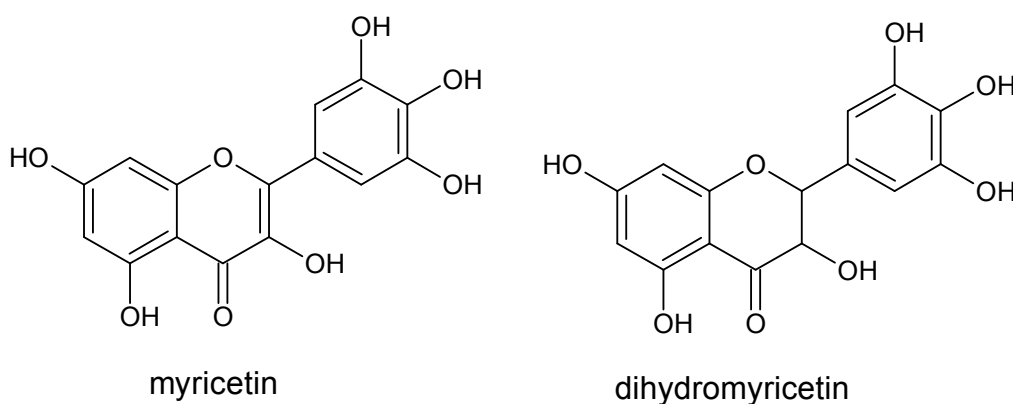
#### 1.4.1.2 Vybrané flavonoidní sloučeniny

V této části kapitoly jsou uvedeny podrobnosti o flavonoidních sloučeninách, které byly vybrány pro experimentální část této práce.

##### Myricetin

Myricetin patří mezi přirozeně se vyskytující flavonoly, jeho struktura je znázorněná na Obr. 9. Vyskytuje se např. ve vlašských ořechách, cibuli, hroznovém vínu, třešních, borůvkách a rybízu. Je též obsažen v červeném víně [46,47]. Myricetin se vyskytuje převážně ve formě glykosidu. Myricetin má antioxidační, antivirové a protizánětlivé účinky, je schopný vylučovat volné radikály [48]. Byla zjištěna možná souvislost mezi konzumací myricetinu a snížením rizika vzniku některých typů rakoviny [47,49]. Vedle antioxidačních účinků byly však prokázány i prooxidační účinky myricetinu [48].

V řadě studií byla zkoumána interakce myricetinu s cytochromy P450. Z výsledků některých studií vyplývá, že myricetin inhibuje lidský CYP3A4 a CYP2C9 [50–52], a dále též lidský CYP1A1 a CYP1B1 [53], nicméně výsledky jsou zatím nejednoznačné.



**Obr. 9:** Struktura myricetinu a dihydromyricetinu

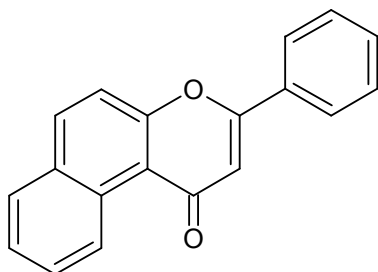
##### Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (též ampelopsin), jehož struktura je znázorněná na Obr. 9, se od myricetinu strukturně liší pouze absencí dvojné vazby. Dihydromyricetin je obsažen např. v léčivé rostlině *Ampelopsis grossedentata* vyskytující se v Číně, z níž se vyrábí léčivý ratanový čaj [54]. Známější je však jeho výskyt v rostlině *Hovenia dulcis* (v český název dužistopka sladká), nazývané též „japonský rozinkový strom“ [55]. *Hovenia dulcis* je

strom, který se běžně nachází ve východní Asii (v Japonsku, Korey, východní Číně). Konzumují se z něj dužnaté stopky, které se po usušení podobají vzhledem i chutí rozinkám. Extrakt z *Hovenia dulcis* se používá v tradiční čínské medicíně mimo jiné ke zmírnění intoxikace po nadměrné konzumaci alkoholu (bylo zjištěno, že podporuje eliminaci alkoholu tím, že zvyšuje aktivitu alkoholdehydrogenasy a acetaldehyddehydrogenasy) [55,56]. V současné době je tedy zkoumán především vliv dihydromyricetinu na zmírnění účinku alkoholu. V nedávné studii provedené na potkanech bylo zjištěno, že dihydromyricetin potlačuje akutní intoxikaci alkoholem, snižuje abstinenci příznaky a dokonce snižuje chuť na další konzumaci alkoholu [57]. Dihydromyricetin by tedy mohl v budoucnu sloužit jako terapeutikum při akutní otravě alkoholem nebo při léčbě závislosti na alkoholu. Už nyní je dostupný jako potravní doplněk. Vedle již zmíněných účinků má dihydromyricetin ještě další farmakologicky významné účinky: protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační, antihypertenzní, hepatoprotektivní či antikarcinogenní [58–60].

### **β-Naftoflavon**

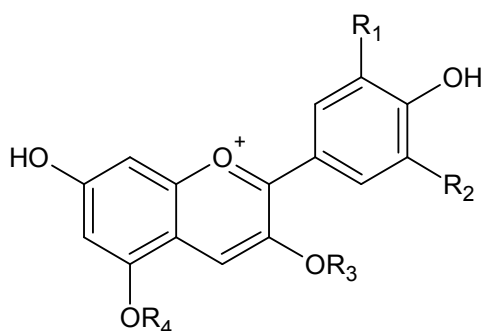
β-Naftoflavon neboli 5,6-benzoflavon je syntetický flavonoid, jehož struktura je znázorněná na Obr. 10. β-Naftoflavon působí jako agonista AhR a indukuje tak např. enzymy CYP1A1 a 1A2 [2,61]. β-Naftoflavon je považován za sloučeninu s možnými chemopreventivními účinky. Výsledky některých studií naznačují, že β-naftoflavon potlačuje rozvoj nádorů mléčné žlázy u potkanů [62–64]. V další studii bylo prokázáno, že β-naftoflavon inhibuje proces karcinogeneze v játrech potkanů způsobený aflatoxinem B1 (silný přírodní karcinogen) [65]. Na druhé straně však některé studie uvádí, že β-naftoflavon zvyšuje oxidační stres a v játrech potkanů může též podporovat rozvoj nádorů [66,67].



**Obr. 10:** Struktura β-naftoflavonu

## Antistax

Antistax je volně prodejný lék k prevenci a léčbě chronické žilní nedostatečnosti (k léčbě křečových žil a zánětu žil). Přípravek Antistax obsahuje jako účinnou látku výtažek z červených listů vinné révy. Nejdůležitějšími aktivními látkami červených listů vinné révy jsou flavonoidy [68]. Konkrétně se jedná o anthokyaniny, jejichž struktura je znázorněná na Obr. 11. Anthokyaniny jsou pigmenty přítomné v květech, plodech i listech rostlin. V přírodě se vyskytují ve formě glykosidů, jejich aglykony se nazývají anthokyanidiny. Anthokyaniny mají antioxidační a protizánětlivé účinky, také snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění [46,69].



**Obr. 11:** Struktura anthokyaninů, upraveno podle [69]

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, - může být skupina -OH, -OCH<sub>3</sub> nebo -H; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> -sacharidová složka nebo -H

## 2 Cíl

Cílem předkládané diplomové práce bylo určit vliv p.o. podaných flavonoidních sloučenin myricetinu, dihydromyricetinu a přípravku Antistax na indukci a aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 v játrech a CYP1A1 v tenkém střevě potkanů. Dalším záměrem této práce bylo objasnění účinku sekvenčního p.o. podání modelové chemopreventivní sloučeniny  $\beta$ -naftoflavonu (induktora podrodiny CYP1A) a potravního karcinogenu PhIP při podání potkanům po 72 h na indukci a aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 v játrech a tenkém střevě potkanů. Posledním úkolem této práce bylo zjištění vlivu intraperitoneálně podaného karcinogenu Sudanu I na indukci a aktivitu CYP1A1 v tenkém střevě potkanů.

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Materiál a chemikálie**

##### **Api Chem, Čína**

Dihydromyricetin

##### **BD Biosciences, USA**

BD Supersomes<sup>TM</sup> – rat CYP1A1

##### **Boehringer Ingelheim, Německo**

přípravek Antistax (360 mg potahované tablety)

##### **British drug houses, Velká Británie**

Sudan I

##### **Fluka, Švýcarsko**

akrylamid, dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkптоethanol, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS),  $\alpha$ -tokoferol

##### **Friesland ČR, a.s., Česká republika**

sušené mléko Milli – odtučněné

##### **Lachema Brno, Česká republika**

bromfénolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnan draselný, dithioničitan sodný, ethanol, glycerol, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, vínán sodný

##### **Linde, Česká republika**

kapalný dusík, oxid uhelnatý, suchý led

##### **Millipore Corp., USA**

Immobilon – NC transfer membrána (nitrocelulosaová)



**Reanal Budapešť, Maďarsko**

glycin

**Sevapharma, a.s., Česká republika**

hovězí sérový albumin (BSA)

**Serva, Německo**

Coomassie brilliant blue R-250 (CBB), N,N,N',N' - tetramethyldiamin (TEMED),  
Triton X-100

**Setuza a.s., Česká republika**

slunečnicový olej Vegetol

**Sigma- Aldrich, USA**

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), 4,4'-dikarboxy-2,2'-  
bicinchoninová kyselina (BCA), 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin,  $\beta$ -naftoflavon,  
resorufin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH), sekundární králičí  
anti-IgY protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou

**Sigma- Aldrich, ČR**

myricetin

**Thermo Scientific, USA**

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa)

**Toronto Research Chemicals, Inc., Canada**

2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)

**Whatman, USA**

Whatman papír, č. 3

Protilátky proti CYP1A1/1A2 a proti CYP1A2 byly připraveny prof. RNDr. Petrem  
Hodkem, CSc., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.

## **3.2 Přístroje**

### **Aparatura pro „Western blotting“**

Whatman Biometra Fastblot, Německo

### **Analytické váhy**

PESA 40SM-200, Švýcarsko;

### **Automatické mikropipety**

BioHit (Finsko), Nichiryo (Japonsko)

### **Centrifugy**

Janetzki K23, Německo; Janetzki K24, Německo; Beckman Coulter- Optima™ LE-80K ultracentrifuga, USA, úhlový rotor Ti 45 a Ti 70; stolní minicentrifuga Labnet, USA  
Cetrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor, Německo

### **Elektroforetická aparatura**

Amersham Biosciences Hoefer™ miniVE, USA

### **Inkubátor**

IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Flow Laboratories

### **Luminescenční spektrofotometr**

PerkinElmer LS55, USA

### **Přístroj pro produkci ultračisté vody**

Simplicity 185 Millipore Corp., USA

### **Sonikátor**

Elma E 30H-p-LAB, Německo

### **Spektrofotometr**

Specord M40 Carl Zeiss Jena, Německo; Sunrise Absorbance Reader, TECAN

**Zdroj pro elektroforézu**

EPS 301 Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech, USA

**Další použité přístroje:**

injekční mikrostříkačka MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton, Švýcarsko;

magnetická míchačka Monotherm Variomag, Německo; pH metr ATI Orion 370, USA;

předvážky KERN EW 600-2M, Německo a KERN EW 440-35N, Německo;

skleněný Potterův-Elvehjemův homogenizátor; mixer Vortex 3, IKA- Werke GmBH&Co.KG, Německo

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Premedikace potkanů

Pokusy se zvířaty byly prováděny v Centru pro experimentální biomodely v Praze, Česká republika, na základě povolení č. 31845/2008. použití samci laboratorních potkanů kmene Wistar (~200 g). Potkani se nejprve týden aklimatizovali při 22°C, po 12 hodinách se jim střídalo období dne a noci, měli stálý přístup k vodě a potravě.

➤ **premedikace potkanů flavonoidními sloučeninami**

Potkanům byly podávány po dobu 4 dnů (celkem tedy 4 dávky) gaváží do žaludku flavonoidní sloučeniny myricetin a dihydromyricetin, v dávce 60 mg/kg potkana, rozpuštěné ve slunečnicovém oleji (0,5 ml). Po 24 h od poslední dávky byli potkani usmrceni.

Potkanům byl dále podáván přípravek Antistax, který obsahuje flavonoidní sloučeniny anthokyaniny. Tablety Antistaxu byly nejprve rozdrceny v třecí misce, následovala extrakce vodou. Takto získaný vodný extrakt byl podáván denně potkanům gaváží do žaludku v dávce 60 mg/kg potkana (0,5 ml) po dobu 4 dnů. Po 24 h od poslední dávky byli potkani usmrceni.

➤ **sekvenční podání flavonoidu  $\beta$ -naftoflavonu a karcinogenu PhIP**

První skupině potkanů byla podána gaváží do žaludku jedna dávka  $\beta$ -naftoflavonu (60 mg/kg potkana) rozpuštěného ve slunečnicovém oleji (0,5 ml). Po následujících 72 h byla týmž potkanům podána gaváží do žaludku jedna dávka PhIP (50 mg/kg potkana) rozpuštěného ve slunečnicovém oleji (0,5 ml). Po následujících 24 h byli potkani usmrceni.

Obě látky byly potkanům podány též samostatně: druhé skupině potkanů byla podána 1 dávka samotného  $\beta$ -naftoflavonu (60 mg/kg potkana), zvířata byla usmrcena 96 h po premedikaci. Třetí skupině potkanů byla podána 1 dávka samotného PhIP (50 mg/kg potkana), zvířata byla usmrcena 24 h po premedikaci. Pro lepší názornost je sekvenční podání uvedeno schematicky v Tab. 3, str. 37.

**Tab. 3:** Schéma sekvenčního podání  $\beta$ -naftoflavonu a karcinogenu PhIP

	skupiny potkanů		
	1.	2.	3.
1. den	$\beta$ -naftoflavon	$\beta$ -naftoflavon	-
2. den	-	-	-
3. den	-	-	-
4. den	PhIP	-	PhIP
5. den	usmrcení potkanů		

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

➤ **premedikace kontrolních potkanů**

Kontrolní skupině potkanů bylo podáváno gaváží do žaludku po dobu 4 dnů 0,5 ml slunečnicového oleje, 24 hodin po poslední dávce byla zvířata usmrcena.

➤ **premedikace potkanů Sudanem I**

Potkanům byl intraperitoneálně podáván po dobu tří dnů karcinogen Sudan I (20 mg/kg potkana) rozpuštěný ve slunečnicovém oleji.

Po usmrcení potkanů byla odebrána játra a tenké střevo. Tenké střevo bylo dále rozděleno na tři části: proximální, střední a distální část (každá část měla délku přibližně 20 cm). Proximální část střeva byla oddělena přibližně 2 cm pod žaludkem.

### 3.3.2 Izolace mikrosomální frakce

**Puf 1:** 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 50  $\mu$ M vitamin E (přidán ze zásobního methanolového roztoku těsně před použitím)

**Puf 2:** 0,1 M  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,4

**Puf 3:** 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; 20% (v/v) glycerol; pH 7,4

Izolace mikrosomální frakce z jater a tenkého střeva potkanů byla provedena diferenční centrifugací z homogenátů tkání. Celý proces izolace probíhal v chlazené místnosti při 4 °C, všechny nástroje a roztoky byly před použitím vychlazeny.

Zmražená játra a tři části tenkého střeva byly vyjmuty z -80 °C mrazicího boxu, zváženy, opláchnuty v pufu 1 a poté byly rozstříhány na malé kousky. Jaterní tkáň byla ještě několikrát promyta pufem 1 pro co nejdokonalejší odkrvení. Následovala homogenizace tkáně, nejprve ve volnějším, poté v těsnějším skleněném

Potter-Elvehjemově homogenizátoru v pufru 1, jehož objem odpovídal čtyřnásobku hmotnosti příslušné tkáně. Získaný homogenát byl centrifugován 10 minut při 600 g a teplotě 0-5 °C (centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4x70 ml, 2000 RPM).

Supernatant byl uchován v chladu a sediment rehomogenizován v 1/4 původního objemu pufru 1. Následovala centrifugace rehomogenátu za výše uvedených podmínek. Oba získané supernatanty byly smíseny a následně centrifugovány 20 minut při 15 000 g při teplotě 0-5 °C (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor, 6x35 ml, 13 500 RPM). Získaný supernatant byl opatrně oddělen od pelety a ultracentrifugován 75 minut při 123 000 g a teplotě 4 °C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor, Ti 45, 6x70ml, 35 000 RPM).

Supernatant po centrifugaci byl odlit (tj. cytosolární frakce), peleta byla homogenizována v pufru 2, jehož objem odpovídal dvojnásobku hmotnosti původní tkáně. Homogenát byl následně ultracentrifugován 75 minut při 425 000 g a teplotě 4 °C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti70, 8x26,3 ml, 60 000RPM).

Získaný supernatant byl odlit a peleta mikrosomů byla resuspendována v objemu pufru 3 odpovídajícímu 1/5 hmotnosti původní tkáně. Takto připravená mikrosomální frakce byla rozdělena do mikrozkušavek dle Eppendorfa, zmrazena kapalným dusíkem a uchována v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

### 3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

**Činidlo A:** 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,95% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,16% (w/v) vínán sodný (w/v); 0,4% (w/v)  $\text{NaOH}$ , pH 11,25

**Činidlo B:** 4% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Wiechelmana a kol [70]. Tato metoda je založena na tvorbě modrofialového komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Aminokyseliny tryptofan, tyrosin a cystein redukují měďnaté ionty přítomné v činidle na měďné. Intenzita zabarvení stanovovaná spektrofotometricky při 562 nm je přímo úměrná koncentraci proteinů.

Vzorky mikrosomů byly nejprve vhodně naředěny destilovanou vodou (jaterní vzorky 50x - 150x; střevní vzorky 6,25x - 25x) do sterilních zkumavek dle Eppendorfa. Každý vzorek byl připraven ve třech různých ředěních a každý typ ředění byl z důvodu

eliminace chyb stanovován v „tripletech”. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentracích 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml. Standardy byly stanovovány v „dubletech”.

Činidlo pro stanovení proteinů bylo připraveno rozpuštěním BCA v 50 dílech činidla A a 1 díle činidla B tak, aby výsledná koncentrace BCA byla 1%. Činidlo B bylo přidáno do činidla A až po úplném rozpuštění BCA. Činidlo bylo připraveno těsně před stanovením.

Do jamek 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 9  $\mu$ l standardů nebo vzorků, poté bylo do každé jamky přidáno 260  $\mu$ l činidla. „Blank” obsahoval místo roztoku proteinů 9  $\mu$ l destilované vody. Standardy byly stanovovány v „dubletech”, vzorky mikrosomů v „tripletech”. Následovala inkubace 30 minut při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> incubator). Poté byla změřena absorbance při 562 nm na čtečce mikrotitrační destičky (Sunrise Absorbance Reader), data byla vyhodnocena v programu Kim32 [71].

### 3.3.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

**Pufr A:** 0,375 M Tris/HCl ; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8

**Polymerační roztok A:** 30% (w/v) akrylamid v pufru A s 0,8% (w/v) BIS

**Pufr B:** 0,125 M Tris/HCl; pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,00006% (w/v) bromfenolová modř

**Polymerační roztok B:** 30% (w/v) akrylamid v pufru B s 0,8% (w/v) BIS

**4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr:** 0,25 M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2- merkaptoethanol; 40% (v/v) glycerol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

**2x koncentrovaný redukující vzorkový pufr:** 0,125 M Tris/HCl; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) 2- merkaptoethanol; 20% (v/v) glycerol; 0,002% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

**Elektrodový pufr:** 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS

**Barvicí lázeň:** 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová

**Odbarvovací lázeň:** 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

pro 4 gely:

**8% gel A (směs pro přípravu separačního gelu):** 20,9 ml pufru A; 7,6 ml polymeračního roztoku A; 28,5  $\mu$ l TEMED; 285  $\mu$ l persíranu amonného o koncentraci 100 mg/ml

**3% gel B (směs pro přípravu zaostřovacího gelu):** 9 ml pufru B; 1000  $\mu$ l polymeračního roztoku B; 10  $\mu$ l TEMED; 200  $\mu$ l persíranu amonného o koncentraci 100 mg/ml

SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je metoda sloužící k dělení proteinů. Dodecylsírán sodný (SDS) způsobí denaturaci proteinů a udělí všem proteinům záporný náboj. Proteiny se tak pohybují v elektrickém poli pouze podle své molekulové hmotnosti. Tato metoda byla prováděná podle postupu Laemmliho [72].

Čistá skla odmaštěná ethanolem byla vložena do elektroforetické aparatury a mezi ně byl nalit roztok pro přípravu 8% gelu A (separačního gelu). Ihned poté byl roztok pro přípravu gelu převrstven destilovanou vodou a ponechán polymerovat 30 minut. Poté byla destilovaná voda odlita a prostor mezi skly nad ztuhnutým gelem vysušen filtračním papírem. Separační gel byl převrstven roztokem pro přípravu 3% gelu B (zaostřovacího gelu), do něhož byl ihned vložen hřeben pro vytvoření jamek. Po 20 minutách polymerace gelu byl hřeben vyjmut a elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem.

Vzorky mikrosomů byly naředěny ultračistou vodou (Simplicity 185 Millipore Corp.) na koncentraci 2 mg/ml, poté byly smíseny se vzorkovým pufrem v poměru 3:1 (4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr), nebo byly naředěny na koncentraci 3 mg/ml a následně smíseny se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 (2x koncentrovaný redukující vzorkový pufr). Jako standard byl použit CYP1A1 připravený ve formě Supersomů (BD supersomes<sup>TM</sup>, BD Biosciences), který byl nejprve 60x naředěn MQ vodou, poté smísen se 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem v poměru 3:1. Vzorky byly povařeny 5 minut ve vodní lázni. Do jamek gelu bylo nanášeno pomocí mikrostříkačky 20  $\mu$ l vzorků mikrosomů, množství proteinů v jamce tedy odpovídalo 30  $\mu$ g (u obou způsobů ředění). Dále bylo nanášeno 7  $\mu$ l standardu CYP1A1 a 6  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder).

Aparatura byla vložena do elektroforetické vany naplněné elektrodovým pufrem. Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání 30 minut při napětí 80 V. Po průchodu vzorků zaostřovacím gelem bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo indikované bromfenolovou modří doputovalo přibližně 0,5 cm od spodního okraje separačního gelu.



Z gelu po elektroforéze byl odříznut zaostřovací gel. Separační gel byl umístěn na 1 h do barvicí lázně. Poté byl gel odbarvován přes noc v odbarvovací lázni. Gel určený pro metodu „Western blotting” nebyl barven.

### 3.3.5 Metoda „Western blotting”

**Přenosový pufr:** 0,025 M Tris; 0,192 M glycin; pH 8,3

**PBS Triton X-100:** 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,2; 0,3% (w/v) Triton X-100

**Blokovací roztok:** 5% (w/v) roztok odtučněného sušeného mléka v PBS Triton X-100

Metoda „Western blotting” slouží k určení relativního množství proteinů ve vzorku. Rozdělené proteiny jsou metodou elektropřenosu přeneseny z gelu na membránu, kde jsou detekovány pomocí specifické protilátky [73].

Gel po elektroforéze byl za stálého míchání inkubován 30 minut v přenosovém pufru. Mezitím byla podle velikosti gelu nastříhána nitroceluloseová membrána a chromatografický papír (Whatman 3). Nitroceluloseová membrána byla opatrně smočena v destilované vodě (dokud se neponořila na dno) a následně vložena na cca 1 minutu do přenosového pufru. Tři papíry Whatman 3 byly smočeny v přenosovém pufru a umístěny na anodu elektropřenosového aparátu. Na ně byla položena membrána, na níž byl umístěn gel, který byl následně převrstven třemi papíry Whatman 3 smočenými v přenosovém pufru. Z takto vzniklého sendviče byly vytlačeny vzduchové bubliny pomocí skleněné tyčinky. Po přiklopení víka s anodou byl proveden elektropřenos: 45 min při proudové hustotě 3,5 mA/cm<sup>2</sup> membrány. Po ukončení elektropřenosu byla membrána přes noc inkubována v blokovacím roztoku při 4 °C za stálého míchání, aby se na membráně zablokovala místa, na která nebyly přeneseny proteiny z gelu, a předešlo se tak nespecifickému navázání protilátky. Gel po elektropřenosu byl pro kontrolu přenosu barven 1 h v barvicí lázni, poté byl umístěn přes noc do odbarvovací lázně.

Druhý den byla membrána inkubována 2 h s primární slepičí protilátkou proti potkaním CYP1A1/1A2 nebo CYP1A2 za stálého míchání na třepačce. Primární protilátka byla rozpuštěna v blokovacím roztoku na koncentraci 30 µg/ml. Poté byla membrána promývána 5 x 4 minuty v blokovacím roztoku. Následovala 1 h inkubace se sekundární protilátkou – králičí IgG proti slepičí IgY konjugovanou alkalickou fosfatase, naředěnou

v poměru 1:1430 v blokovacím roztoku. Po inkubaci byla membrána promývána 3 x 5 minut v blokovacím roztoku, 2 x 5 minut v PBS Triton X-100 a nakonec 2 x 5 minut v destilované vodě. Membrána byla vyvolána pomocí BCIP/NBT tablety rozpuštěné v 10 ml destilované vody (BCIP/NBT tableta obsahuje 10 mg substrátu pro alkalickou fosfatasu). Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody. Membrána byla nakonec vysušena mezi listy filtračního papíru.

### 3.3.6 Optimalizace metody „Western blotting“

V průběhu elektroforézy a metody „Western blotting“ dochází často ke kontaminaci keratinem, která se projevuje nežádoucími rozmazanými proužky, skvrnami či vertikálními proužky na membráně v oblasti 50 - 70 kDa. Pro odstranění nežádoucích projevů této kontaminace byl k primární protilátce přidán zdroj keratinu, aby se jím protilátka vysytila, a na membráně s ním již nereagovala [74].

K 500 µl primární slepičí protilátky proti potkanímu CYP 1A1/1A2 o koncentraci 29 mg/ml bylo přidáno cca 50 mg keratinizované kůže (obroušené z paty), směs byla inkubována 2 dny při 4 °C za občasného promíchání. Poté byla směs krátce centrifugována při 2 000 g (Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor, 6000 RPM) a vysycená protilátka byla odebrána.

### 3.3.7 Stanovení ethoxyresorufin-*O*-deethylační a methoxyresorufin-*O*-demethylační aktivity

**Fosfátový pufr:** 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4; pH bylo upraveno přidavkem 1 M KOH

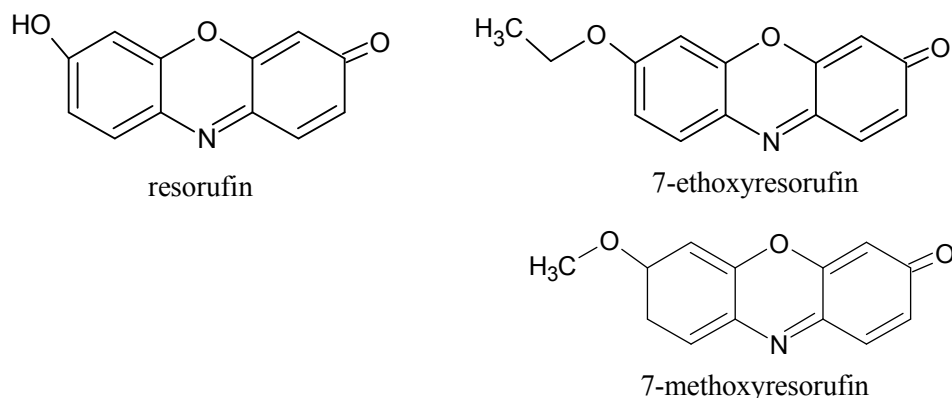
**Roztok resorufinu:** 10 µM resorufin v methanolu

**Substrát:** 0,2 mM 7-ethoxyresorufin (nebo 7-methoxyresorufin) v DMSO

**Kofaktor:** 5 mM NADPH v destilované vodě

Ethoxyresorufin-*O*-deethylační (EROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro sledování aktivity enzymů podrodiny CYP1A (1A1, 1A2). Tyto enzymy jsou hlavními enzymy, které katalyzují deethylaci 7-ethoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin. Methoxyresorufin-*O*-demethylační (MROD) aktivita pak byla použita pro sledování aktivity enzymu CYP1A2, který katalyzuje demethylaci

7-methoxyresorufinu na resorufin. Struktura resorufinu, 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu je znázorněna na Obr. 12.



**Obr. 12:** Struktura resorufinu, 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu

Vzorky mikrosomů byly naředěny fosfátovým pufrem tak, aby výsledná koncentrace proteinů odpovídala 0,5 mg/ml a celkový objem 500  $\mu$ l. Tato směs byla lehce promíchána na vortexu, následně k ní byl přidán specifický substrát 7-ethoxyresorufin (nebo 7-methoxyresorufin) tak, aby jeho konečná koncentrace byla 2,2  $\mu$ M. Tato směs byla lehce promíchána na vortexu a inkubována 2 minuty za laboratorní teploty. Z každé inkubační směsi byly přemístěny tři aliquoty po 150  $\mu$ l do tří jamek 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Do jamky, ve které byl „blank“, bylo přidáno 17  $\mu$ l fosfátového pufru, do zbylých dvou jamek bylo přidáno 17  $\mu$ l 5 mM NADPH, která reakci iniciuje. Ihned poté byla měřena fluorescence vznikajícího resorufinu (Luminescence Spectrometer Perkin Elmer LS-55) v deseti 60-ti sekundových cyklech při excitační a emisní vlnové délce 530 a 585 nm. Množství vzniklého resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky sestavené z 8 bodů: 1,9; 3,8; 7,5; 15,0; 22,5; 30,0; 45,0 a 60,0 pmol resorufinu na jamku. Jednotlivé koncentrace standardu byly připraveny ředěním 10  $\mu$ M zásobního roztoku resorufinu v methanolu fosfátovým pufrem, vzorky byly připraveny v „dubletech“. Jako „blank“ byl použit fosfátový pufr.

### 3.3.8 Stanovení obsahu cytochromu P450

**Pufr:** 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2% (v/v) glycerol; pH 7,4; pH bylo upraveno přidavkem 1 M KOH

Metoda pro stanovení obsahu cytochromu P450 v mikrosomálních frakcích využívá měření absorbance charakteristického komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [4]. Stanovení koncentrace cytochromů P450 se provádí metodou diferenčních spekter.

Do zkumavky bylo pipetováno 1980  $\mu\text{l}$  pufru a 20  $\mu\text{l}$  vzorku jaterních mikrosomů. Pro redukci cytochromu P450 bylo do zkumavky přidáno malé množství dithioničitanu sodného (~5 mg). Vzorek byl lehce promíchán a poté byl rozdělen po 1 ml do dvou kyvet o optické dráze 1 cm. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 byla proměřena základní linie v rozmezí 400 - 490 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 45 s proudem oxidu uhelnatého, ihned poté bylo proměřeno diferenční spektrum.

Ve vzorcích může být přítomné též určité množství neaktivní formy CYP, která absorbuje při 420 nm. Při této vlnové délce absorbují však i další hemoproteiny, např. hemoglobin, které mohou být přítomny jako kontaminanty. Pro kompenzaci příspěvku hemoglobinu (nebo jiných hemoproteinů), bylo tedy provedeno měření v uspořádání, kdy byly nejprve obě kyvety syceny proudem CO, až poté byla vzorková kyveta redukována. Do zkumavky bylo pipetováno 1980  $\mu\text{l}$  pufru a 20  $\mu\text{l}$  jaterních mikrosomů. Vzorek byl lehce promíchán a poté byl rozdělen po 1 ml do dvou kyvet o optické dráze 1 cm. Obě kyvety byly syceny po dobu 45 s proudem oxidu uhelnatého. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 byla proměřena základní linie v rozmezí 400 - 490 nm. Pro redukci cytochromu P450 bylo do vzorkové kyvety přidáno malé množství dithioničitanu sodného (~2,5 mg), vzorek byl promíchán a po chvíli bylo proměřeno diferenční spektrum.

Koncentrace aktivní formy cytochromu P450 přítomné ve vzorcích mikrosomů byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$c_{\text{CYP450}} = [(A_{450} - A_{490}) / (\epsilon_{450} - \epsilon_{490})] \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

$c_{\text{CYP450}}$  koncentrace aktivní formy CYP v  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$A_{450}$  ,  $A_{490}$  absorbance při 450 nm, absorbance při 490 nm

$\epsilon_{450} - \epsilon_{490}$  rozdíl molárních absorpčních koeficientů pro CYP při 450 a 490 nm, rozdíl je  $0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$  [4]

Pro vypočtení množství neaktivní formy CYP byl použit následující vztah:

$$c_{\text{CYP420}} = [(A_{420} - A_{490}) / (\epsilon_{420} - \epsilon_{490})] \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

$c_{\text{CYP420}}$	koncentrace neaktivní formy CYP v $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
$A_{420}, A_{490}$	absorbance při 420 nm, absorbance při 490 nm
$\epsilon_{420} - \epsilon_{490}$	rozdíl molárních absorpčních koeficientů pro CYP při 420 a 490 nm, rozdíl je $0,110 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ [4]

Dále bylo provedeno měření pro stanovení hemoglobinu (či jiných hemoproteinů). Hemoglobin absorbuje v komplexu s CO při 420 nm v redukovaném i v oxidovaném stavu [75] Do zkumavky bylo pipetováno 1980  $\mu\text{l}$  pufru a 20  $\mu\text{l}$  vzorku jaterních mikrosomů. Vzorek suspenze byl lehce promíchán a poté byl rozdělen po 1 ml do dvou kyvet o optické dráze 1 cm. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 byla proměřena základní linie v rozmezí 400 - 490 nm. Poté byla vzorková kyveta sycena 45 s proudem oxidu uhelnatého. Ihned poté bylo proměřeno diferenční spektrum.

### 3.3.9 Stanovení specifického obsahu cytochromu P450

Specifický obsah cytochromu P450 byl vypočítán podle následujících vztahů:

$$s.o._{\text{CYP450}} = c_{\text{CYP450}} / \text{konc}_{\text{proteinu}} \quad ; \quad s.o._{\text{celkCYP}} = (c_{\text{CYP450}} + c_{\text{CYP420}}) / \text{konc}_{\text{proteinu}}$$

$s.o._{\text{CYP450}}$	specifický obsah aktivní formy CYP [nmol/mg]
$s.o._{\text{celkCYP}}$	specifický obsah celkových CYP [nmol/mg] (tzn. aktivní formy + neaktivní formy CYP)
$c_{\text{CYP450}}$	koncentrace aktivní formy CYP [ $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ]
$c_{\text{CYP420}}$	koncentrace neaktivní formy CYP [ $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ]
$\text{konc}_{\text{proteinu}}$	koncentrace proteinů [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]

## 4 Výsledky

### 4.1 Izolace mikrosomální frakce a stanovení koncentrace proteinů

Mikrosomální frakce byly izolovány z jater a tří částí tenkého střeva (proximální, střední a distální části) potkanů. Potkanům byly podávány flavonoidní sloučeniny  $\beta$ -naftoflavon, myricetin, dihydromyricetin a přípravek Antistax obsahující anthokyaniny; dále karcinogeny – PhIP, Sudan I (viz kapitola 3.3.1, str. 36). Pro přiblížení situaci při expozici člověka byly potkanům látky podávány gaváží do žaludku. Výjimku tvoří Sudan I, který byl potkanům podáván intraperitoneálně. Kontrolním potkanům byl podáván pouze slunečnicový olej.

V jednotlivých mikrosomálních frakcích byla stanovena koncentrace proteinů pomocí BCA (viz kapitola 3.3.3, str. 38). Výchozí hmotnost tkáně a hodnoty koncentrace proteinů jsou uvedeny v Tab. 4, 5 a 6, str. 46, 47, 48.

**Tab. 4:** Charakterizace mikrosomální frakce z tenkého střeva kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných flavonoidními sloučeninami.

Mikrosomální frakce z tenkého střeva				
vzorek	část orgánu	hmotnost tkáně [g]	koncentrace proteinů [mg/ml]	objem mikrosomální frakce [ml]
Kontrola	P	2,9	8,3	0,8
	S	2,5	7,8	0,7
	D	3,2	10,7	0,5
Myricetin	P	3,4	7,3	0,65
	S	4,0	8,2	0,8
	D	4,2	10,2	0,7
Antistax	P	2,7	8,8	0,4
	S	2,6	8,2	0,5
	D	3,1	10,5	0,5
Dihydromyricetin	P	4,9	11,5	0,75
	S	5,0	10,1	0,75
	D	3,9	13,5	0,65

P – proximální část, S - střední část, D - distální část tenkého střeva

**Tab. 5:** Charakterizace mikrosomální frakce z tenkého střeva potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem a karcinogeny.

Mikrosomální frakce z tenkého střeva				
vzorek	část orgánu	hmotnost tkáně [g]	koncentrace proteinů [mg/ml]	objem mikrosomální frakce [ml]
$\beta$ -naftoflavon	P	2,5	9,4	0,6
	S	4,8	12,4	0,9
	D	3,0	7,3	0,7
$\beta$ -naftoflavon + PhIP	P	2,4	6,4	0,75
	S	3,1	8,2	0,8
	D	3,2	8,2	1
PhIP	P	2,8	11,8	0,65
	S	3,4	11,2	1
	D	3,0	10,2	0,9
Sudan I	P	6,1	11,2	2,1
	S	6,2	14,3	1,1
	D	4,9	10,7	1

P – proximální část, S - střední část, D - distální část tenkého střeva

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

**Tab. 6:** Charakterizace mikrosomální frakce z jater kontrolních potkanů, potkanů premedikovaných flavonoidními sloučeninami a karcinogeny

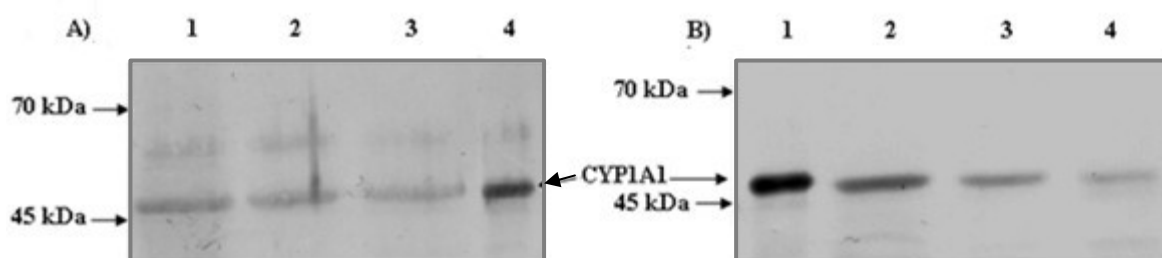
<b>Mikrosomální frakce z jater</b>			
<b>vzorek</b>	<b>hmotnost tkáně [g]</b>	<b>koncentrace proteinů [mg/ml]</b>	<b>objem mikrosomální frakce [ml]</b>
Kontrola	19,9	41,3	2,6
β-naftoflavon	18,1	56,4	5,9
β-naftofavon+PhIP	19,6	42,2	4,7
PhIP	20,9	42,3	1,7
Myricetin	19,1	40,5	4,6
Antistax	20,5	57,5	3,0
Dihydromyricetin	25,7	38,2	5,0

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin



## 4.2 Optimalizace metody „Western blotting“

Pro úvodní experimenty byla provedena metoda „Western blotting“ podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5, str. 41. Jelikož se na membráně objevovaly nežádoucí rozmazané proužky, skvrny či vertikálními proužky v oblasti 50 - 70 kDa způsobené kontaminací keratinem, bylo nutné metodu optimalizovat podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.6, str. 42. K primární protilátce byl přidán keratin, protilátka se jím vysytila a na membráně s ním již nereagovala. Příklad úspěšného odstranění interference keratinu je uveden na Obr. 13.



**Obr. 13:** Porovnání membrány s kontaminací keratinem A) a bez kontaminace keratinem B), v případě B) byla primární slepičí protilátka proti 1A1/1A2 vysycena keratinem.

Dráhy 1 - 3 A) a 2-4 B) obsahují vzorky mikrosomů z tenkého střeva potkanů, kterým byl podán  $\beta$ -naftoflavon+PhIP:

A): 1-  $\beta$ -naftoflavon+PhIP proximální, 2- střední, 3- distální část tenkého střeva

B): 2-  $\beta$ -naftoflavon+PhIP proximální, 3- střední, 4- distální část tenkého střeva

Dráhy 4 A) a 1)B obsahují standard CYP1A1 připravený v Supersomech

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

## 4.3 Vliv zkoumaných látek na indukci cytochromu P450

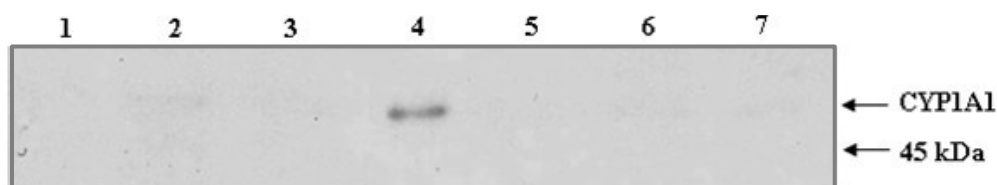
Pomocí metody „Western blotting“ (kapitola 3.3.5, str. 41) byl zkoumán vliv jednotlivých flavonoidních látek a karcinogenů na indukci CYP1A1 a 1A2 v játrech a tenkém střevě potkanů, tedy v hlavních orgánech podílejících se na metabolismu xenobiotik.

### 4.3.1 Vliv vybraných flavonoidních sloučenin na indukci CYP1A1 a 1A2

Potkanům byly podávány po dobu 4 dnů flavonoidní sloučeniny myricetin, dihydromyricetin a též přípravek Antistax, který obsahuje flavonoidy anthokyaniny (dávka 60 mg/kg). Pro přiblížení situaci při expozici člověka byly látky podány potkanům p.o. gaváží do žaludku, následně byl zkoumán jejich vliv na indukci CYP1A1, 1A2 v játrech

a CYP1A1 v jednotlivých částech tenkého střeva (proximální, střední a distální část - nejvzdálenější od žaludku).

Z Obr. 14 a 15 je patrné, že dihydromyricetin ani myricetin neindukují CYP1A1 v žádné části tenkého střeva. U přípravku Antistax lze pozorovat velmi slabou indukci CYP1A1 v proximální části tenkého střeva, v ostatních částech tenkého střeva není indukce patrná.



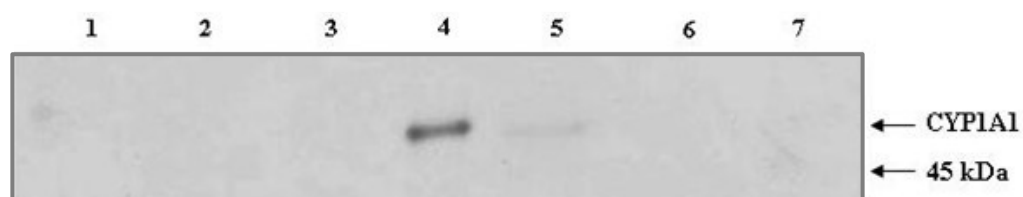
**Obr. 14:** Vliv dihydromyricetinu na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů.

Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1-3 : kontrola proximální (1), střední (2) a distální (3) část tenkého střeva

4: standard CYP1A1 připravený v Supersomech

5-7: dihydromyricetin proximální (5), střední (6) a distální (7) část tenkého střeva



**Obr. 15:** Vliv myricetinu a Antistaxu na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů.

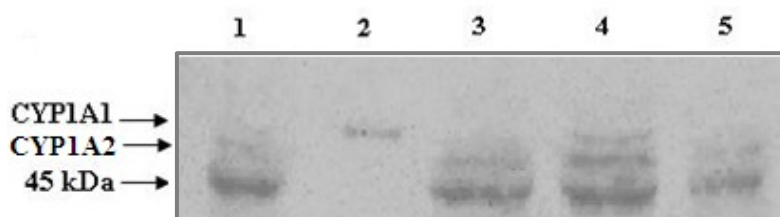
Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1-3: myricetin proximální (1), střední (2) a distální (3) část tenkého střeva

4: standard CYP1A1 připravený v Supersomech

5-7: Antistax proximální (5), střední (6) a distální (7) část tenkého střeva

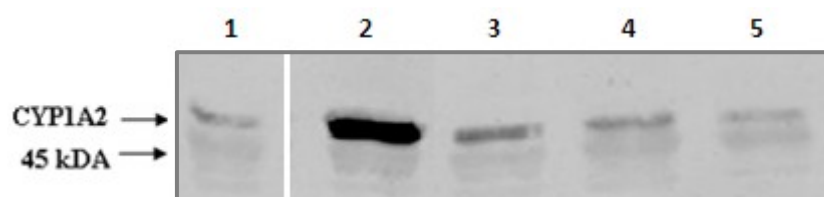
Na Obr. 16 a 17, str. 51 je znázorněn indukční efekt myricetinu, dihydromyricetinu a přípravku Antistax v játrech. Pro lepší znázornění byly membrány vyvolány jednak primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2 a dále primární slepičí protilátkou proti CYP1A2. Z Obr. 16 a 17, str. 51 vyplývá, že myricetin slabě indukuje CYP1A1 v játrech, dihydromyricetin ani přípravek Antistax CYP1A1 v játrech neindukují.



**Obr. 16:** Vliv myricetinu, dihydromyricetinu a Antistaxu na indukci CYP1A1 a 1A2 v játrech potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1: kontrola, 2: standard CYP1A1 připravený v Supersomech; 3: dihydromyricetin, 4: myricetin, 5: Antistax

U všech vzorků včetně kontroly na Obr. 17 jsou patrné zóny v oblasti, kde se nachází CYP1A2. V případě Antistaxu je tato zóna slabší než u kontroly (kontrolním potkanům byl podáván pouze slunečnicový olej), nezvýšil tedy expresi CYP1A2 v játrech potkanů. Dihydromyricetin a myricetin lze v porovnání s kontrolou považovat za slabé induktory CYP1A2 v játrech potkanů.



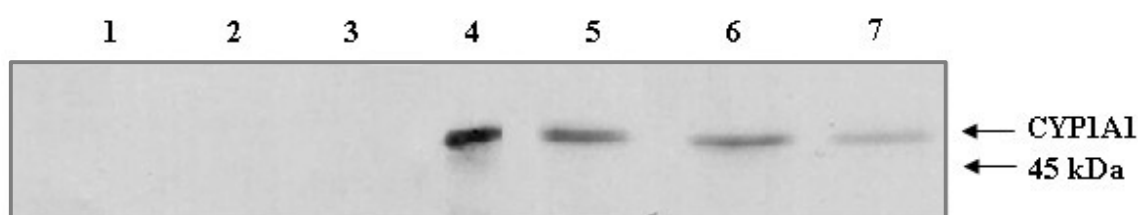
**Obr. 17:** Vliv myricetinu, dihydromyricetinu a Antistaxu na indukci CYP1A2 v játrech potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A2. Jako standard byly použity jaterní mikrosomy potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren (dráha 2)

1: kontrola, 2: benzo[a]pyren, 3: dihydromyricetin, 4: myricetin, 5: Antistax

#### 4.3.2 Vliv sekvenčního podání chemopreventivní látky a karcinogenu na indukci CYP

Pro přiblížení situaci při expozici člověka nebyl zkoumán jen vliv samotných flavonoidních látek na indukci CYP1A, ale byla provedena i studie sekvenčního podání modelové chemopreventivní látky  $\beta$ -naftoflavonu, který indukuje CYP1A, a následně po 72 h karcinogenu PhIP, reprezentujícího potravní karcinogeny. Potkanům byla podána jedna dávka samotného  $\beta$ -naftoflavonu (60 mg/kg) a samotného PhIP (50 mg/kg), dále jim byla podány obě látky postupně – nejprve  $\beta$ -naftoflavon a po 72 h PhIP.

Na Obr. 18 lze vidět indukční efekt  $\beta$ -naftoflavonu v tenkém střevě potkanů. Největší indukce CYP1A1 způsobená  $\beta$ -naftoflavonem je pozorovatelná v proximální části tenkého střeva, směrem k distální části tenkého střeva indukce CYP1A1 postupně klesá. V případě podání induktoru  $\beta$ -naftoflavonu společně s karcinogenem PhIP (viz Obr. 19) lze pozorovat stejný trend poklesu indukce CYP1A1 od proximální k distální části tenkého střeva. V porovnání s podáním samotného  $\beta$ -naftoflavonu zde došlo k nepatrně silnější indukci CYP1A1 v proximální části tenkého střeva a naopak k malému úbytku indukce CYP1A1 ve střední části střeva. Potravní karcinogen PhIP, který byl potkanům podán samostatně, nezpůsobil indukci CYP1A1 v žádné části tenkého střeva potkanů – viz Obr. 20, str. 53.



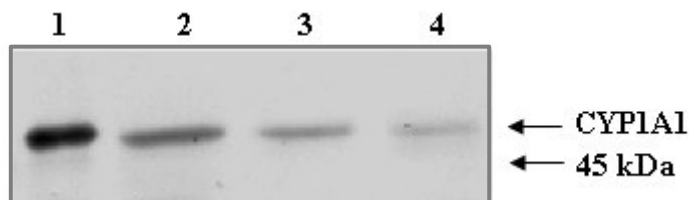
**Obr. 18:** Vliv  $\beta$ -naftoflavonu na indukci CYP1A1 v tenkém střevě.

Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1-3: kontrola proximální (1), střední (2) a distální (3) část tenkého střeva

4: standard CYP1A1 připravený v Supersomech

5-7:  $\beta$ -naftoflavon proximální (5), střední (6) a distální (7) část tenkého střeva

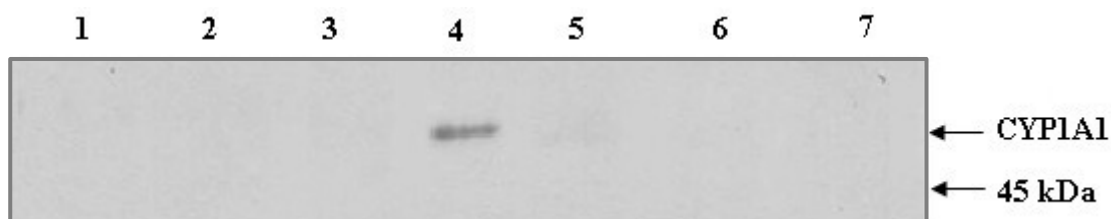


**Obr. 19:** Vliv sekvenčního podání  $\beta$ -naftoflavonu a PhIP na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1: standard CYP1A1 připravený v Supersomech

2-4:  $\beta$ -naftoflavon + PhIP proximální (2), střední (3) a distální (4) část tenkého střeva

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin



**Obr. 20:** Vliv karcinogenu PhIP na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů.

Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

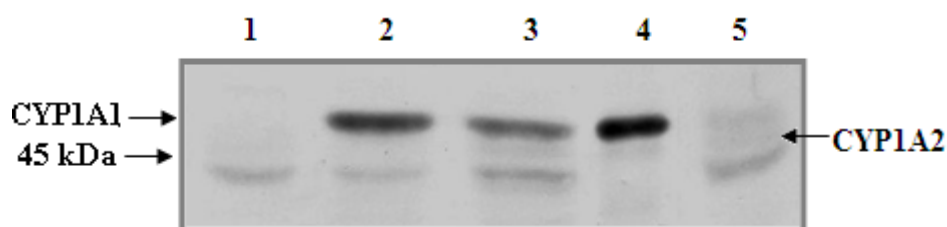
1-3: kontrola proximální (1), střední (2) a distální (3) část tenkého střeva

4: standard CYP1A1 připravený v Supersomech

5-7: PhIP proximální (5), střední (6) a distální (7) část tenkého střeva

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

Na Obr. 21 a Obr. 22, str. 54 je znázorněn indukční efekt  $\beta$ -naftoflavonu,  $\beta$ -naftoflavonu podaného společně s PhIP a samotného PhIP v játrech. Pro lepší znázornění byly membrány vyvolány jednak primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2 a dále primární slepičí protilátkou proti CYP1A2.  $\beta$ -naftoflavon podle očekávání způsobil v játrech silnou indukci CYP1A1. U  $\beta$ -naftoflavonu podaného s PhIP byla indukce CYP1A1 v játrech slabší než u samotného  $\beta$ -naftoflavonu. Karcinogen PhIP CYP1A1 v játrech neindukuje. V játrech tedy došlo k malému úbytku indukce CYP1A1 u potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem s PhIP oproti potkanům premedikovaných pouze  $\beta$ -naftoflavonem.



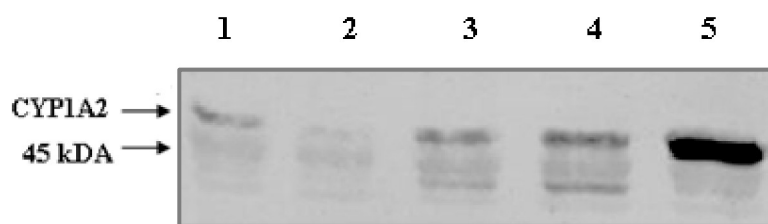
**Obr. 21:** Vliv  $\beta$ -naftoflavonu,  $\beta$ -naftoflavonu + PhIP, PhIP na indukci CYP1A1 a CYP1A2 v játrech potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2.

1: kontrola, 2:  $\beta$ -naftoflavon, 3:  $\beta$ -naftoflavon + PhIP

4: standard CYP1A1 připravený v Supersomech, 5: PhIP

PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

Z Obr. 22, str. 54 je patrné, že PhIP indukoval CYP1A2 v játrech potkanů, slabší indukce CYP1A2 se vyskytla po podání  $\beta$ -naftoflavonu společně s PhIP. V kontrolním vzorku jaterních mikrosomů se také objevila slabá indukce CYP1A2.  $\beta$ -Naftoflavon nezpůsobil v játrech potkanů žádnou indukci CYP1A2.

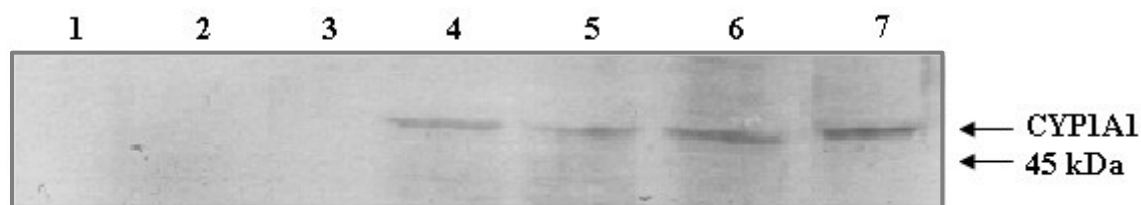


**Obr. 22:** Vliv β-naftoflavonu, β-naftoflavonu + PhIP, PhIP na indukci CYP1A2 v játrech potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A2. Jako standard byly použity jaterní mikrosomy potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren (dráha 5)

1: kontrola, 2: β-naftoflavon, 3: β-naftoflavonu + PhIP, 4: PhIP, 5: benzo[a]pyren  
PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

#### 4.3.3 Vliv Sudanu I na indukci cytochromu P450 v tenkém střevě

Sudan I je karcinogen, který je navíc účinným induktorem podrodiny CYP1A v játrech. Potkanům byl jako jediný podán intraperitoneálně a následně byl studován jeho vliv na indukci CYP1A1 v tenkém střevě. Výsledek je znázorněn na Obr. 23. Sudan I indukuje CYP1A1 v proximální, střední i distální části tenkého střeva potkanů. Na rozdíl od látek, které byly potkanům podány p.o., není v případě intraperitoneálního podání vidět postupný úbytek indukce CYP1A1 od proximální k distální části střeva. Naopak, nejsilnější indukce CYP1A1 Sudanem I je v distální části tenkého střeva (nejslabší ve střední části).



**Obr. 23:** Vliv Sudanu I na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů. Membrána byla vyvolaná primární slepičí protilátkou proti CYP1A1/1A2. Jako standard byly použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných β-naftoflavonem (dráha 7)

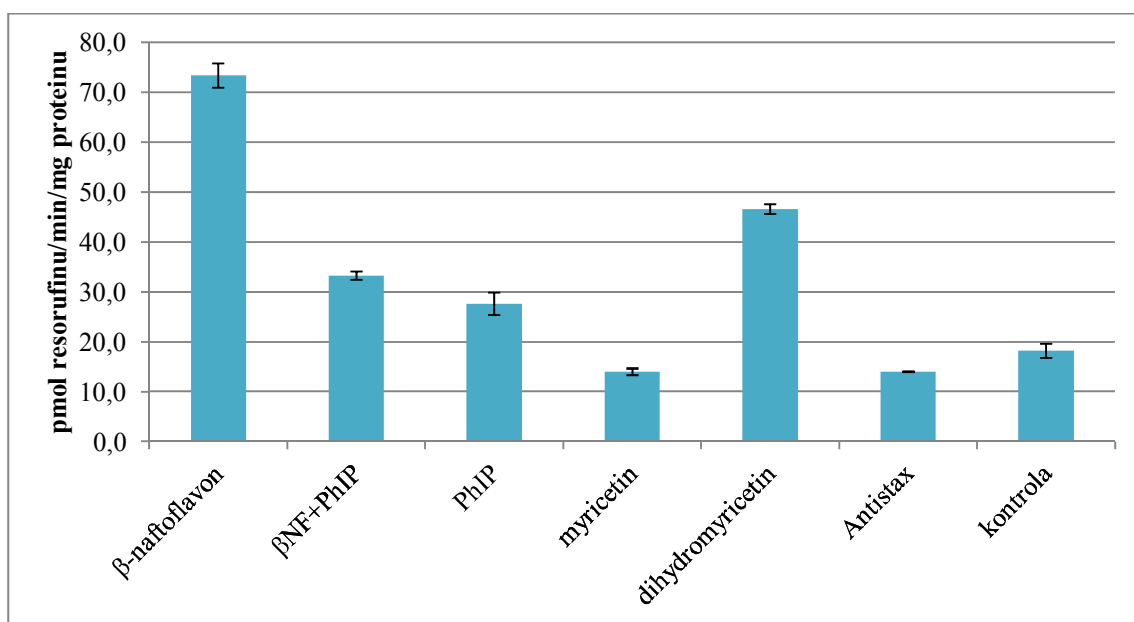
1-3: Kontrola proximální (1), střední (2) a distální část tenkého střeva  
4-6: Sudan I proximální (4), střední (5) a distální (6) část tenkého střeva  
7: β-naftoflavon

#### 4.4 Vliv zkoumaných látek na enzymovou aktivitu CYP1A1 a CYP1A2

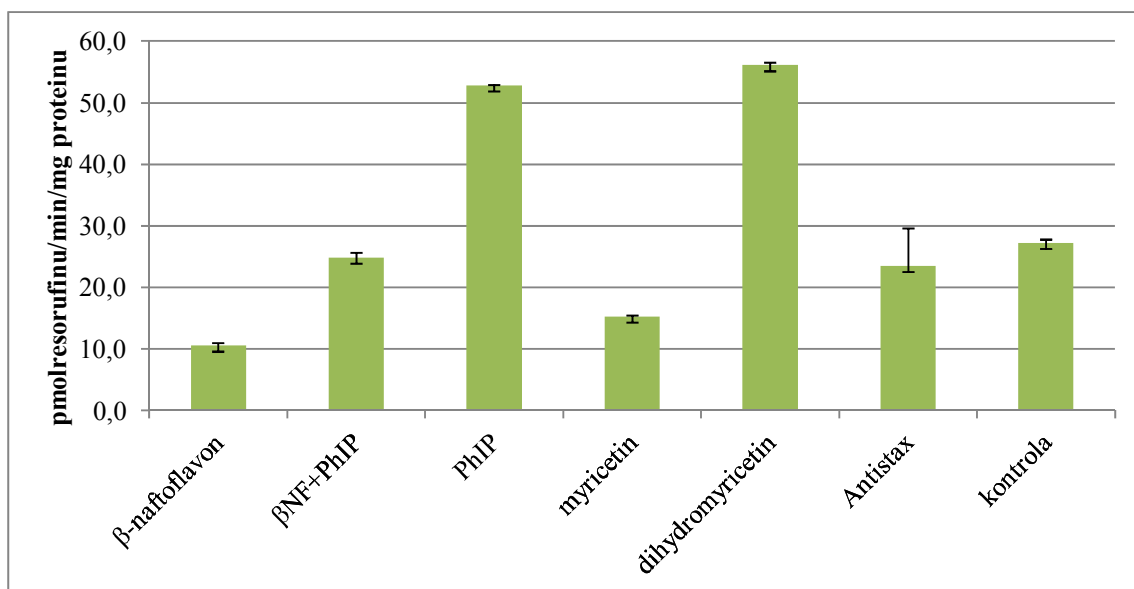
7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylační (EROD) aktivita a 7-methoxyresorufin-*O*-demethylační (MROD) aktivita byly použity jako „markerové“ reakce pro sledování aktivity CYP1A1 a 1A2. Oba tyto enzymy katalyzují deethylaci 7-ethoxyresorufinu, enzym CYP1A2 pak demethylaci 7-methoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin.

Na Obr. 24 a 25, str. 56 je znázorněno porovnání EROD aktivity a MROD aktivity ve všech vzorcích jaterních mikrosomů. V sekvenčních studiích způsobil největší nárůst EROD aktivity v játrech  $\beta$ -naftoflavon. EROD aktivita naměřená v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem s PhIP byla přibližně 2x nižší než v případě aplikace samotného  $\beta$ -naftoflavonu, a jen o 5 pmol resorufinu/min/mg proteinu vyšší než u samotného PhIP. Při sekvenčním podání způsobilo nejvyšší MROD aktivitu podání PhIP. Toto odpovídá i výsledku imunodetekce, kde PhIP způsobil nejvyšší indukci CYP1A2.  $\beta$ -Naftoflavon podaný spolu s PhIP ani samotný  $\beta$ -naftoflavon MROD aktivitu nezvýšily.  $\beta$ -Naftoflavon naopak způsobil výrazný pokles MROD aktivity oproti kontrole, což odpovídá i výsledku imunodetekce, kde  $\beta$ -naftoflavon nezpůsobil žádnou indukci CYP1A2.

Z flavonoidních látek podávaných potkanům způsobil vzrůst EROD i MROD aktivity v játrech pouze dihydromyricetin (viz Obr. 24 a 25, str. 56). V mikrosomech izolovaných z jater potkanů premedikovaných myricetinem i Antistaxem byla naměřena nižší EROD i MROD aktivita než u kontroly. Naměřené hodnoty MROD aktivity byly u všech flavonoidních látek vyšší než hodnoty EROD aktivity.



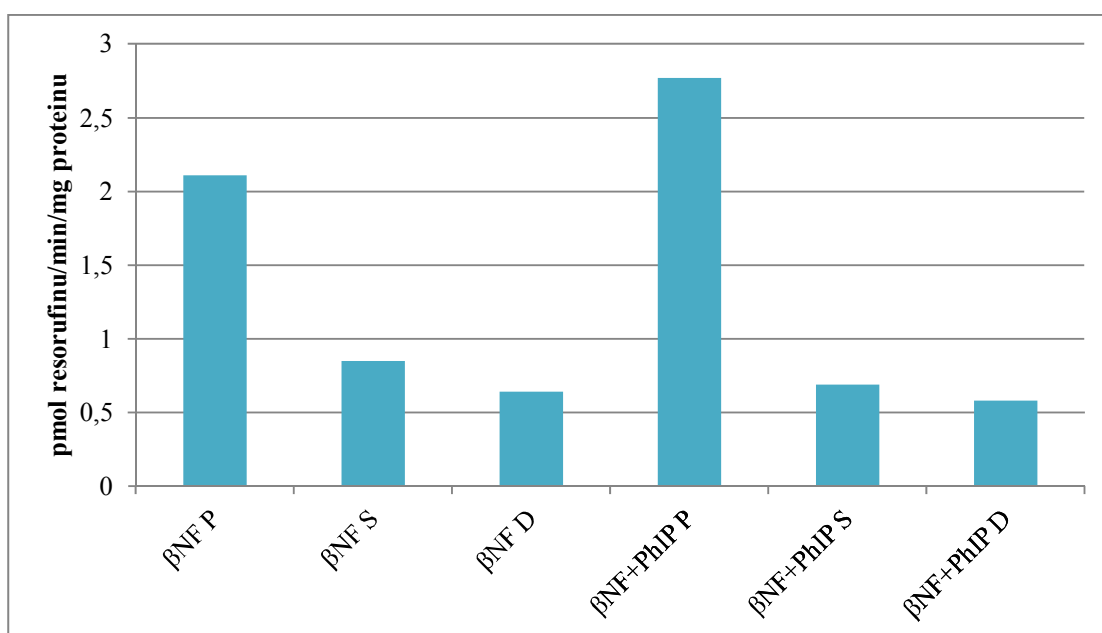
**Obr. 24:** Vliv zkoumaných látek na EROD aktivitu CYP1A1/2 v jaterních mikrosomech potkanů. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty ze dvou měření, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.  
βNF – β-naftoflavon; PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin



**Obr. 25:** Vliv zkoumaných látek na MROD aktivitu CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty ze dvou měření, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.  
βNF – β-naftoflavon; PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

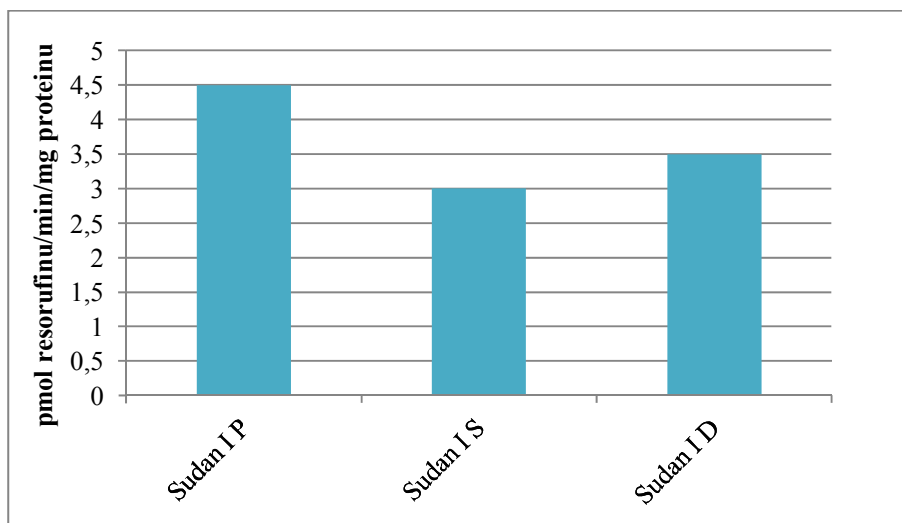


V tenkém střevě byla pomocí metody „Western blotting“ zjištěna indukce CYP1A1 pouze po podání  $\beta$ -naftoflavonu (Obr. 18, str. 52),  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP (Obr. 19, str. 52) a také Sudanu I (Obr. 23, str. 54). Myricetin, dihydromyricetin, Antistax ani PhIP neindukovaly CYP1A1 v tenkém střevě, proto u nich nebyla měřena EROD aktivita. Naměřené hodnoty EROD aktivity v mikrosomech z tenkého střeva byly nízké, nepřesáhly hodnotu 5 pmol resorufinu/min/mg proteinu. U sekvenční studie podání  $\beta$ -naftoflavonu a karcinogenu PhIP znázorněné na Obr. 26 hodnoty EROD aktivity postupně klesaly od proximální k distální části tenkého střeva. Nejvyšší EROD aktivitu způsobil  $\beta$ -naftoflavon podaný s PhIP, a to v proximální části tenkého střeva.



**Obr. 26:** Vliv  $\beta$ -naftoflavonu a  $\beta$ -naftoflavonu podaného s PhIP na EROD aktivitu CYP1A1 v mikrosomech z tenkého střeva potkanů  
 $\beta$ BNF –  $\beta$ -naftoflavon; PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin  
P – proximální, S- střední, D- distální část tenkého střeva

Vliv Sudanu I na EROD aktivitu v tenkém střevě je znázorněn na Obr. 27, str. 58. Nejvyšší aktivita CYP1A1 byla naměřena v proximální části, nejnižší ve střední části tenkého střeva potkanů.



**Obr. 27:** Vliv Sudanu I na EROD aktivitu CYP1A1 v mikrosomech z tenkého střeva potkanů.

P – proximální, S- střední, D- distální část tenkého střeva

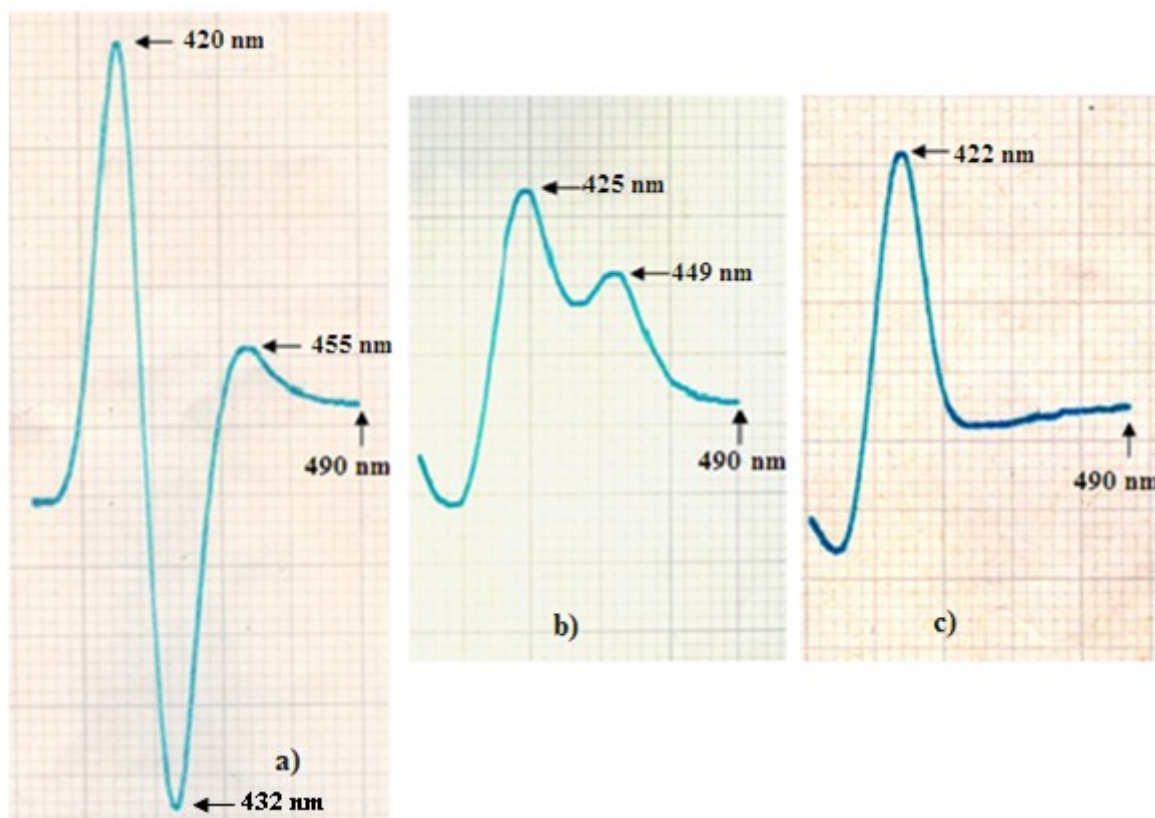
#### 4.5 Stanovení obsahu cytochromu P450

V jaterních vzorcích mikrosomů byl stanoven obsah cytochromu P450 metodou popsanou v kapitole 3.3.7, str. 42, dále byl vypočítán specifický obsah cytochromu P450 (kapitola 3.3.8, str. 44). Ve střevních vzorcích nebylo z důvodu nízkého obsahu CYP měření provedeno.

Cytochrom P450 v redukovaném stavu v komplexu s CO vykazuje absorpční maximum při 450 nm [4]. Při využití tohoto způsobu měření (referentní a vzorková kyveta byly redukovány dithioničitanem sodným, vzorková kyveta byla poté sycena proudem CO), se ve spektru objevil malý vrchol při 450 nm a neobvykle velký vrchol při 420 nm. Hemoglobin absorbuje v komplexu s CO při 420 nm v redukovaném i v oxidovaném stavu [75]. Pro kompenzaci příspěvku hemoglobinu (nebo jiných hemoproteinů), bylo provedeno měření, při kterém byly obě kyvety nejprve syceny proudem CO, až poté byla vzorková kyveta redukována (viz 3.3.7, str. 42). V získaném spektru byl vrchol při 420 nm výrazně menší než u předchozího způsobu měření, naopak vrchol při 450 nm (aktivní forma CYP) vzrostl. Při měření pro stanovení hemoproteinů (např. hemoglobinu) v jaterních vzorcích mikrosomů (referentní a vzorková kyveta obsahovaly pouze vzorky mikrosomů, vzorková kyveta byla poté sycena proudem CO) (viz 3.3.7, str. 42) se ve spektru objevil výrazný

vrchol při 420 nm dokazující přítomnost hemoproteinu schopného vázat CO (např. hemoglobinu).

Na Obr. 28 je znázorněn reprezentativní příklad těchto tří způsobů měření, a to diferenční spektra, k jejichž měření byly použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných myricetinem.



**Obr. 28:** Reprezentativní příklad diferenčních spekter cytochromu P450 z jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných myricetinem (na ose x je vynesena vlnová délka v nm, na ose y absorbance):

- diferenční spektrum redukováného CYP v komplexu s CO (referentní a vzorková kyveta byly redukovány dithioničitanem sodným, vzorková kyveta byla poté sycena CO)
- diferenční spektrum redukováného CYP v komplexu s CO s odečtením příspěvku hemoglobinu (referentní a vzorková kyveta byly syceny CO, vzorková kyveta byla poté redukována dithioničitanem sodným)
- diferenční spektrum hemoglobinu v komplexu s CO (referentní a vzorková kyveta obsahovaly pouze mikrosomy naředěné fosfátovým pufrům, vzorková kyveta byla poté sycena CO)

Při měření diferenčního spektra v uspořádání b) (Obr. 28, str. 59, referentní a vzorková kyveta byly syceny CO, vzorková kyveta byla poté redukována dithioničitanem sodným) dochází k odečtení příspěvku hemoglobinu (či jiného hemoproteinu). Z tohoto spektra byla vypočítána koncentrace aktivní i neaktivní formy CYP ve vzorcích jaterních mikrosomů, a to podle vztahů uvedených v kapitole 3.3.7, str. 42. Ze získaných hodnot byl dále vypočítán specifický obsah aktivní formy CYP a pro porovnání i specifický obsah celkových CYP (získaný součtem aktivní a neaktivní formy CYP) podle vztahu uvedeného v kapitole 3.3.8, str. 44. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7.

**Tab. 7:** Koncentrace a specifický obsah CYP v jaterních mikrosomech kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných flavonoidními látkami nebo karcinogenem PhIP.

vzorek	konc <sub>protein</sub> [mg/cm <sup>3</sup> ]	c <sub>CYP450</sub> [μM]	c <sub>CYP420</sub> [μM]	c <sub>celk CYP</sub> [μM]	S.O. CYP450 [nmol/mg]	S.O. celk CYP [nmol/mg]
Kontrola	41,3	26,1	22,7	48,8	0,63	1,18
βNF	56,4	26,1	18,75	44,85	0,46	0,80
βNF + PhIP	42,2	20,6	29,5	50,1	0,49	1,19
PhIP	42,3	32,3	25,6	57,9	0,76	1,37
Myricetin	40,5	23,4	31,7	55,1	0,58	1,36
Antistax	57,5	30,2	31,8	62	0,53	1,08
Dihydromyricetin	38,2	23,4	19,3	42,7	0,61	1,12

konc<sub>protein</sub> - koncentrace proteinů, c<sub>CYP450</sub> - koncentrace aktivní formy CYP

c<sub>CYP420</sub> - koncentrace neaktivní formy CYP

c<sub>celk CYP</sub> - koncentrace celkových CYP (aktivní + neaktivní formy CYP)

S.O. CYP450 - specifický obsah aktivní formy CYP

S.O. celk CYP - specifický obsah celkových CYP

βNF - β-naftoflavon; PhIP- 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

Z Tab. 7 je patrné, že u některých vzorků jaterních mikrosomů (β-naftoflavon podaný společně s PhIP, myricetin, Antistax) je větší podíl neaktivní formy CYP než aktivní formy CYP. Nejnížší specifický obsah aktivních CYP byl zjištěn u mikrosomů izolovaných z jater potkanů premedikovaných β-naftoflavonem, u tohoto vzorku byl zároveň i nejnížší specifický obsah celkových CYP (aktivní + neaktivní formy CYP).

## 5 Diskuze

V současné době se rozšířilo užívání přírodních chemopreventivních sloučenin ve formě potravních doplňků. Mezi slibné chemopreventivní látky patří fytochemikálie, flavonoidy. Díky jejich přírodnímu původu je jejich užívání považováno za bezpečné. Na flavonoidy je však třeba nahlížet i jako na látky cizorodé, které mohou mít v organismu vedle prospěšného působení též řadu dalších biologických účinků [2]. Flavonoidy mohou ovlivňovat metabolismus xenobiotik prostřednictvím interakce s cytochromy P450, klíčovými enzymy I. fáze biotransformace. Tyto enzymy katalyzují reakce, které vedou jak k detoxikaci xenobiotik, tak k jejich metabolické aktivaci na látky s vyšší toxicitou. Některé cytochromy P450, zejména CYP1A1 a CYP1A2, se významně podílí na aktivaci karcinogenů [3]. Flavonoidy prostřednictvím indukce těchto CYP nebo stimulace jejich aktivity mohou zvýšit aktivaci karcinogenů a tím i riziko vzniku rakoviny [2].

V této diplomové práci byl proto zkoumán vliv vybraných flavonoidních sloučenin a potravních karcinogenů na indukci enzymů CYP1A1 a CYP1A2 v játrech a tenkém střevě potkanů, významných orgánech metabolismu xenobiotik. Tenké střevo je dlouhý orgán, u potkanů měří cca 90 cm, a skládá se ze tří částí: dvanáctníku (*duodenum*), lačnicku (*jejunum*) a kyčelníku (*ileum*). Zajímalo nás, zda se bude exprese CYP v jednotlivých částech tenkého střeva lišit. Proto bylo tenké střevo potkanů po expozici sloučenin rozděleno na tři části: proximální (~přibližně odpovídající *duodenu*), střední (přibližně odpovídající *jejunu*) a distální část (přibližně odpovídající *ileu*). Z těchto tří částí tenkého střeva a z jater potkanů byla izolována mikrosomální frakce. Ke zjištění indukce CYP byla použita metoda „Western blotting“. Současně byla stanovena specifická aktivita pomocí „markerové“ reakce CYP1A1 a CYP1A2 s 7-ethoxyresorufinem (stanovení EROD aktivity) a CYP1A2 s 7-methoxyresorufinem (stanovení MROD aktivity).

Mezi zkoumané flavonoidní sloučeniny patřil dihydromyricetin - potenciální přípravek pro zvýšení tolerance na ethanol - a jeho strukturní analog myricetin. Dále byl zkoumán směsný přípravek Antistax, který obsahuje flavonoidní sloučeniny anthokyaniny. Tyto látky byly potkanům podávány po dobu 4 dnů (dávka 60 mg/kg). V tenkém střevě potkanů nezpůsobil dihydromyricetin ani myricetin žádnou indukci CYP1A1, pouze v případě Antistaxu byla pozorována velmi slabá indukce CYP1A1 v proximální části tenkého střeva potkanů. V játrech potkanů působily dihydromyricetin a myricetin jako slabé induktory CYP1A2, myricetin v játrech potkanů indukoval slabě též CYP1A1.

Antistax v játrech potkanů neindukoval CYP1A1 ani CYP1A2. Dihydromyricetin způsobil jako jediný zvýšení aktivity CYP1A1 a CYP1A2 v játrech potkanů oproti kontrolním potkanům (premedikovaných slunečnicovým olejem), nicméně naměřená aktivita (kolem 50 pmol resorufinu/min/mg proteinu) nebyla oproti kontrole významně zvýšená. Jelikož CYP1A1 a CYP1A2 aktivují řadu karcinogenů, případná indukce těchto enzymů by mohla zvýšit riziko aktivace karcinogenů. Z hlediska bezpečnosti těchto flavonoidních látek, u nichž nebyla prokázána významná indukce CYP1A1 ani CYP1A2, je výsledek tohoto dílčího experimentu pozitivní.

V další části této diplomové práce byl zkoumán vliv sekvenčního podání chemopreventivní látky a karcinogenu. Jako modelová chemopreventivní látka byl vybrán  $\beta$ -naftoflavon, který indukuje enzymy CYP1A1 a CYP1A2. Jako reprezentativní karcinogen byl zvolen PhIP, který je jedním z nejčastěji se vyskytujících heterocyklických aminů v potravě. PhIP je metabolizován zejména CYP1A2 a CYP1A1, které se významně podílí na jeho metabolické aktivaci [35]. Potkanům byla gaváží do žaludku podána jedna dávka  $\beta$ -naftoflavonu (60 mg/kg) a po 72 h jedna dávka PhIP (50 mg/kg). Pro srovnání byly obě látky potkanům podány též samostatně. Tento způsob sekvenčního podání byl zvolen pro přiblížení se možné situaci v reálném životě. Studie [43] prokázaly, že pokud jsou chemopreventivní látka a karcinogen podány současně, chemopreventivní látka může inhibovat aktivaci karcinogenu a prokázat tak svůj pozitivní účinek. V případě sekvenčního podání však nemusí mít žádný chemopreventivní účinek, naopak může dojít ke stimulaci aktivace karcinogenu. Časový interval byl zvolen tak, aby byl zachován indukční efekt  $\beta$ -naftoflavonu, ale aby  $\beta$ -naftoflavon byl již dostatečně eliminován a neinhiboval aktivaci karcinogenů. Jako optimální byl zvolen interval 72 h [76]. V experimentech provedených Koblihovou [76] byla u potkanů premedikovaných samotným  $\beta$ -naftoflavonem pozorována v játrech i tenkém střevě silná indukce CYP1A a též zvýšení aktivity CYP1A. V případě postupného podání  $\beta$ -naftoflavonu a PhIP (po 72 h) došlo k neočekávanému poklesu indukce i aktivity CYP1A v tenkém střevě i játrech potkanů ve srovnání s výsledky experimentu, kdy byl potkanům podán samotný  $\beta$ -naftoflavon [76]. Experiment bylo třeba opakovat.

V souladu s již publikovanými výsledky došlo v tenkém střevě i játrech potkanů k indukci CYP1A1 po premedikaci  $\beta$ -naftoflavonem i  $\beta$ -naftoflavonem s PhIP. V tenkém střevě potkanů způsobilo podání  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP indukci i aktivitu CYP1A1 srovnatelnou s  $\beta$ -naftoflavonem aplikovaným samostatně. Naopak v játrech způsobilo

podání  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP určitý pokles indukce i aktivity CYP1A1 oproti potkanům, kterým byl podán samotný  $\beta$ -naftoflavon (aktivita i indukce CYP1A1 byla po aplikaci  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP cca 2x nižší než v případě samotně aplikovaného  $\beta$ -naftoflavonu). Ve srovnání s již publikovanými výsledky byl tedy pozorován pouze nižší pokles indukce a aktivity CYP1A1 po aplikaci  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP v játrech.

Vedle ovlivnění CYP1A1 byl zkoumán vliv podání  $\beta$ -naftoflavonu a PhIP na expresi a aktivitu CYP1A2 v játrech potkanů. Po podání samotného karcinogenu PhIP došlo k indukci CYP1A2 v játrech potkanů, slabší indukci způsobilo i podání  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP. Výsledky imunodetekce korelovaly s naměřenou aktivitou CYP1A2, která byla nejvyšší po aplikaci PhIP.  $\beta$ -Naftoflavon v játrech potkanů neindukoval CYP1A2 ani nezvýšil jeho aktivitu, ačkoliv je považován za induktora podrodiny CYP1A [77]. Doposud byl zkoumán vliv této látky maximálně 72 h po expozici. V této práci byl zkoumán vliv  $\beta$ -naftoflavonu 96 h po premedikaci a byla zjištěna silná indukce CYP1A1 v játrech i střevech potkanů, k indukci CYP1A2 v játrech však nedošlo. Je tedy možné, že „turn over“ CYP1A2 je kratší než CYP1A1 [78] a po 96 h od indukce jeho hladina klesla pod mez detekce.

Ačkoliv výsledky imunodetekce prokazovaly v játrech potkanů poměrně silnou indukci CYP1A1 po podání  $\beta$ -naftoflavonu, naměřené hodnoty EROD aktivity v játrech byly výrazně nižší než ty, které byly naměřeny Koblihovou (v jejích výsledcích byla hodnota aktivity CYP1A1 v játrech po podání  $\beta$ -naftoflavonu cca 7x vyšší ~500 pmol resorufinu/min/mg proteinu) [76]. Jedním z možných důvodů by mohla být ztráta aktivity CYP během izolace mikrosomů. Proto bylo dále provedeno stanovení obsahu cytochromu P450 v jaterních vzorcích mikrosomů, aby byl zjištěn podíl aktivní formy CYP.

Metoda pro stanovení obsahu cytochromu P450 využívá absorbanci charakteristického komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s CO při 450 nm [4]. Při využití tohoto způsobu měření (referentní a vzorková kyveta byly redukovány dithioničtanem sodným, vzorková kyveta byla poté sycena proudem CO) se v diferenčním spektru objevil malý vrchol při 450 nm a neobvykle intenzivní vrchol při 420 nm naznačující přítomnost značného množství neaktivní formy CYP nebo kontaminaci mikrosomů jinými hemoproteiny, např. hemoglobinem. V diferenčním spektru se navíc objevilo velké minimum při 432 nm. Jelikož redukováná forma hemoglobinu absorbuje právě při 432 nm, vznik toto minima by mohl být způsoben hemoglobinem přítomným

ve vzorcích mikrosomů. K absorpčnímu maximu při 420 nm tedy přispívala neaktivní forma CYP a pravděpodobně hemoglobin (či jiný hemoprotein). Tento předpoklad přítomnosti kontaminujícího hemoproteinu schopného vázat CO v jaterních vzorcích mikrosomů byl potvrzen měřením, kdy referentní a vzorková kyveta obsahovaly neredukované vzorky mikrosomů naředěné fosfátovým pufrům a vzorková kyveta byla sycena proudem CO. Hemoglobin absorbuje v komplexu s CO při 420 nm v redukovaném i v oxidovaném stavu [75]. Pro kompenzaci příspěvku hemoglobinu (či jiných hemoproteinů) bylo tedy provedeno měření, při kterém byly obě kyvety nejprve syceny proudem CO, až poté byla vzorková kyveta redukována. V získaném spektru byl vrchol při 420 nm (neaktivní forma CYP) výrazně menší než u prvního způsobu měření, naopak vrchol při 450 nm (aktivní forma CYP) vzrostl.

Hemoglobin se mohl dostat do vzorků jaterních mikrosomů nejspíš v důsledku špatného odkrvení jaterní tkáně během izolace mikrosomů. Na začátku izolace je nutné jaterní tkáň několikrát promýt pufrům 1 (0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 50  $\mu$ M vitamin E) pro co nejdokonalejší odkrvení. Tento krok byl sice proveden, ale jaterní tkáň nejspíš nebyla promyta dostatečně. Z Tab. 7, str. 60 a z diferenčních spekter (Obr. 28, str. 59) je navíc patrné, že během izolace došlo ke ztrátě aktivity značného množství CYP. U některých vzorků jaterních mikrosomů je větší podíl neaktivní formy CYP než formy aktivní. Příčina ztráty aktivity CYP je neznámá.

Výsledky indukce CYP vyhodnocené pomocí metody „Western blotting“ byly již diskutovány. Separátně je nutné zmínit, že u jaterních vzorků mikrosomů byly na nitrocelulosových membránách patrné zóny v oblasti 45 kDa v případě použití primární slepičí protilátky proti potkaním CYP1A1/1A2 i protilátky proti potkaní CYP1A2. V této oblasti se však nevyskytuje CYP1A1 (molekulová hmotnost 59393 kDa) ani CYP1A2 (molekulová hmotnost 58259 kDa). Jedním z možných vysvětlení je, že použité slepičí protilátky nejsou dostatečně specifické a reagují i s jinými komponentami mikrosomálního preparátu. Další možností je, že během izolace došlo k proteolytické degradaci CYP1A1 a CYP1A2, a tyto zóny tedy přísluší jejich degradačním produktům. U mikrosomů z tenkého střeva nebyl tento jev pozorován.

V této diplomové práci byl dále zkoumán vliv intraperitoneálního podání karcinogenu Sudanu I na indukci CYP1A1 v tenkém střevě potkanů. Je známo [16,79], že Sudan I silně indukuje CYP1A v játrech potkanů. Výsledky této práce prokázaly, že indukuje i CYP1A1 v tenkém střevě potkanů. Sudan I byl jako jediný podán potkanům



intraperitoneálně, abychom mohli porovnat případné odlišnosti s p.o. podáním sloučenin gaváží do žaludku. V případě p.o. podání sloučenin ( $\beta$ -naftoflavonu,  $\beta$ -naftoflavonu podaného s PhIP) byla v tenkém střevě potkanů pozorována nejvyšší indukce i aktivita CYP1A1 v proximální části a postupně klesala k distální části. Na rozdíl od sloučenin podaných p.o. nedochází v případě intraperitoneálního podání Sudanu I k poklesu indukce ani aktivity CYP1A1 podél tenkého střeva od proximální k distální části. Nejvyšší indukci způsobil Sudan I v distální části tenkého střeva, nejvyšší aktivita CYP1A1 byla ale naměřena v proximální části tenkého střeva. V mikrosomech izolovaných ze střední části tenkého střeva potkanů premedikovaných Sudanem I byla pozorována nejnižší indukce CYP1A1 i relativně nejnižší EROD aktivita. Je však třeba zmínit, že naměřené hodnoty EROD aktivity se významně nelišily. Sudan I způsobil v tenkém střevě vyšší aktivitu CYP1A1 než  $\beta$ -naftoflavon nebo  $\beta$ -naftoflavon podaný s PhIP. Potvrdil se tedy předpoklad, že Sudan I, který silně indukuje CYP1A v játrech, bude indukovat silně též CYP1A1 v tenkém střevě.

## 6 Souhrn

Předmětem zkoumání byl vliv vybraných flavonoidních sloučenin a karcinogenů na indukci a aktivitu enzymů CYP1A1 a CYP1A2. Potkanům byly flavonoidní sloučeniny a karcinogeny podány gaváží do žaludku s výjimkou Sudanu I, který byl podán intraperitoneálně. Z jater a tenkého střeva (které bylo rozděleno na proximální, střední a distální část) v mikrosomálních frakcích byla metodou „Western blotting“ vyhodnocena indukce enzymů CYP1A1 a CYP1A2 a byla stanovena specifická aktivita pomocí „markerové“ aktivity CYP1A1 a CYP1A2 s 7-ethoxyresorufinem a CYP1A2 s 7-methoxyresorufinem. Získané výsledky byly porovnány s obsahem CYP ve vzorcích jaterních mikrosomů.

- Dihydromyricetin, myricetin a Antistax nezpůsobily významnou indukci ani významné zvýšení aktivity CYP1A1 a CYP1A2 v játrech ani tenkém střevě potkanů. Dihydromyricetin a myricetin pouze slabě indukovaly CYP1A2 v játrech potkanů, myricetin indukoval v játrech potkanů slabě též CYP1A1. Přípravek Antistax způsobil jen velmi slabou indukci CYP1A1 v proximální části tenkého střeva.
- Dihydromyricetin způsobil jako jediný zvýšení aktivity CYP1A1 a CYP1A2 v játrech potkanů oproti kontrolním potkanům (premedikovaných slunečnicovým olejem), naměřená aktivita ale nebyla v porovnání s kontrolou významně zvýšena.
- Při sekvenčním podání potravního karcinogenu PhIP 72 h po modelové chemopreventivní sloučenině  $\beta$ -naftoflavonu byl v játrech zaznamenán mírný pokles indukce i aktivity CYP1A1 ve srovnání se samotně aplikovaným  $\beta$ -naftoflavonem. V tenkém střevě potkanů byla indukce i aktivita CYP1A1 po podání  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP srovnatelná jako po aplikaci samotného  $\beta$ -naftoflavonu.
- Podání  $\beta$ -naftoflavonu nebo  $\beta$ -naftoflavonu s PhIP ve střevě způsobilo postupný pokles indukce CYP1A1 od proximální části tenkého střeva k distální části po p.o..
- Intraperitoneálně podaný karcinogen Sudan I indukoval srovnatelně CYP1A1 ve všech částech tenkého střeva. Na rozdíl od látek podaných p.o. nedocházelo

v případě intraperitoneálního podání Sudanu I k úbytku indukce CYP1A1 směrem od proximální k distální části tenkého střeva.

## 7 Seznam použité literatury

1. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42.
2. Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 1–21.
3. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229–37.
4. Omura, T., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379–85.
5. <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> (cit. 5.3. 2013)
6. <http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf> (cit. 5.3. 2013)
7. Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P. (1999) Human cytochromes P450. *Mol. Aspects Med.* **20**, 1–137.
8. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., Páca, J. jr. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876–90.
9. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* **95**, 212–22.
10. Coon, M.J., Ding, X.X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB* **6**, 669–73.
11. Williams, S.N., Dunham, E., Bradfield, C.A. (2005), v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P.R. ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 323–46.
12. Guengerich, F.P. (2005), v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P.R. ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 377–463.
13. Waxman, D.J. (1999) P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 11–23.
14. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* **82**, 667–715.
15. Correia, M.A., Ortiz de Montellano, P.R. (2005), v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P.R. ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 247–322.
16. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I is a Potential Carcinogen for Humans Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678–84.

17. Nedelcheva, V., Gut, I. (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**, 1151–75.
18. Souček, P., Gut, I. (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* **22**, 83–103.
19. Drahusuk, A.T., McGarrigle, B.P., Larsen, K.E., Stegeman, J.J., Olson, J.R. (1998) Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture. *Carcinogenesis* **19**, 1361–68.
20. Rendic, S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab. Rev.* **34**, 83–448.
21. Ioannides, C. (2002) *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, John Wiley & Sons, Chichester.
22. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* **94**, 913–18.
23. Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B. (2008) Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **25**, 2097–2116.
24. Stratil, P., Kubáň, V. (2004) Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy* **98**, 379–87.
25. Rosypal, S. (2000) *Úvod do molekulární biologie. Třetí díl, Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA*, Rosypal, Brno.
26. Stiborová, M. (2002) Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy* **96**, 784–91.
27. Williams, G.M. (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* **166**, 3–10.
28. Schut, H.A.J., Snyderwine, E.G. (1999) DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **20**, 353–68.
29. Snyderwine, E.G. (2002) Mammary gland carcinogenesis by food-derived heterocyclic amines: Metabolism and additional factors influencing carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environ. Mol. Mutagen.* **39**, 165–70.
30. Stratil, P., Kubáň, V. (2005) Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vznikající při jejich technologickém zpracování. *Chem. Listy* **99**, 3–12.
31. Sutandyo, N. (2010) Nutritional carcinogenesis. *Acta Medica Indones.* **42**, 36–42.
32. Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S., Sugimura, T. (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* **12**, 1503–6.
33. Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., Ito, N. (1997) The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.* **57**, 195–98.
34. IARC (1993) IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. **56**, 1–599.
35. Crofts, F.G., Sutter, T.R., Strickland, P.T. (1998) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis* **19**, 1969–73.
36. Turesky, R.J. (2007) Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett.* **168**, 219–27.

37. Lin, D., Kaderlik, K.R., Turesky, R.J., Miller, D.W., Lay, J.O., Jr, Kadlubar, F.F. (1992) Identification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, with DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 691–97.
38. Singh, R., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Phillips, D.H., Farmer, P.B., Costa, G.G. da (2010) Detection and quantitation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine adducts in DNA using online column-switching liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **878**, 2155–62.
39. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M. (1995) Benzenediazonium Ion Derived from Sudan I Forms an 8-(Phenylazo)guanine Adduct in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 489–98.
40. Kgzuka, T., Tashiro, M., Sano, S., Fujimoto, K., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Nakaminami, G. (1980) Pigmented contact dermatitis from azo dyes. *Contact Dermatitis* **6**, 330–36.
41. Morse, M.A., Stoner, G.D. (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* **14**, 1737–46.
42. Trock, B., Lanza, E., Greenwald, P. (1990) Dietary Fiber, Vegetables, and Colon Cancer: Critical Review and Meta-analyses of the Epidemiologic Evidence. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 650–61.
43. Hodek, P., Křížková, J., Burdová, K., Šulc, M., Kizek, R., Hudeček, J., Stiborová, M. (2009) Chemopreventive compounds-view from the other side. *Chem. Biol. Interact.* **180**, 1–9.
44. Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo, M., Takasuka, N., Moore, M.A. (2004) Cancer Prevention by Natural Compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **19**, 245–63.
45. Ross, J.A., Kasum, C.M. (2002) Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 19–34.
46. Weng, C.-J., Yen, G.-C. (2012) Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 323–51.
47. Maggiolini, M., Recchia, A.G., Bonofiglio, D., Catalano, S., Vivacqua, A., Carpino, A., Rago, V., Rossi, R., Andò, S. (2005) The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* **35**, 269–81.
48. Ong, K.C., Khoo, H.-E. (1997) Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **29**, 121–26.
49. Nöthlings, U., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N. (2007) Flavonols and Pancreatic Cancer Risk The Multiethnic Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 924–31.
50. Choi, D.-H., Li, C., Choi, J.-S. (2010) Effects of myricetin, an antioxidant, on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite, EXP-3174, in rats: possible role of cytochrome P450 3A4, cytochrome P450 2C9 and P-glycoprotein inhibition by myricetin. *J. Pharm. Pharmacol.* **62**, 908–14.
51. Von Moltke, L.L., Weemhoff, J.L., Bedir, E., Khan, I.A., Harmatz, J.S., Goldman, P., Greenblatt, D.J. (2004) Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 1039–44.

52. Li, C., Lim, S.-C., Kim, J., Choi, J.-S. (2011) Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **36**, 175–82.
53. Chaudhary, A., Willett, K.L. (2006) Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology* **217**, 194–205.
54. Zhang, Y., Que, S., Yang, X., Wang, B., Qiao, L., Zhao, Y. (2007) Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin. *Magn. Reson. Chem. Mrc* **45**, 909–16.
55. Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T. (2010) Hovenia dulcis--an Asian traditional herb. *Planta Med.* **76**, 943–49.
56. Sh, C., Gs, Z., Al, L., Sh, L., Lk, W. (2006) Influence of Hovenia dulcis on alcohol concentration in blood and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) of animals after drinking. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**, 1094–96.
57. Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzalez, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J. (2012) Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *J. Neurosci.* **32**, 390–401.
58. Murakami, T., Miyakoshi, M., Araho, D., Mizutani, K., Kambara, T., Ikeda, T., Chou, W.-H., Inukai, M., Takenaka, A., Igarashi, K. (2004) Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of Ampelopsis grossedentata, and ampelopsin. *Biofactors Oxf. Engl.* **21**, 175–78.
59. Ruan, L.-P., Yu, B.-Y., Fu, G.-M., Zhu, D.-N. (2005) Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 457–64.
60. Ni, F., Gong, Y., Li, L., Abdolmaleky, H.M., Zhou, J.-R. (2012) Flavonoid ampelopsin inhibits the growth and metastasis of prostate cancer in vitro and in mice. *Plos One* **7**, 1–9.
61. Helsby, N.A., Williams, J., Kerr, D., Gescher, A., Chipman, J.K. (1997) The isoflavones equol and genistein do not induce xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse and in human cells. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **27**, 587–96.
62. Malejka-Giganti, D., Bennett, K.K., Culp, S.J., Beland, F.A., Shinozuka, H., Bliss, R.L. (2005) Suppression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis by pre-initiation treatment of rats with beta-naphthoflavone coincides with decreased levels of the carcinogen-derived DNA adducts in the mammary gland. *Cancer Detect. Prev.* **29**, 338–47.
63. Izzotti, A., Camoirano, A., Cartiglia, C., Grubbs, C.J., Lubet, R.A., Kelloff, G.J., De Flora, S. (1999) Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.* **59**, 4285–90.
64. Mori, H., Sugie, S., Rahman, W., Suzui, N. (1999) Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* **143**, 195–98.
65. Gurtoo, H.L., Koser, P.L., Bansal, S.K., Fox, H.W., Sharma, S.D., Mulhern, A.I., Pavelic, Z.P. (1985) Inhibition of aflatoxin B1-hepatocarcinogenesis in rats by beta-naphthoflavone. *Carcinogenesis* **6**, 675–78.
66. Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, K. (2008) beta-Naphthoflavone enhances oxidative stress

- responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats. *Toxicology* **244**, 179–89.
67. Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, M., Nakamura, D., Wakita, A., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K. (2012) Enhanced liver tumor promotion but not liver initiation activity in rats subjected to combined administration of omeprazole and beta-naphthoflavone. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 969–85.
  68. <http://www.antistax.cz> (cit. 20. 4. 2013)
  69. Kähkönen, M.P., Heinonen, M. (2003) Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 628–33.
  70. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231–37.
  71. <http://www.ok.cz/dkitt/> (cit. 5. 3. 2013)
  72. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–85.
  73. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–54.
  74. Bérubé, B., Coutu, L., Lefièvre, L., Bégin, S., Dupont, H., Sullivan, R. (1994) The elimination of keratin artifacts in immunoblots probed with polyclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **217**, 331–33.
  75. Šípal, Z., Anzenbacher, P., Entlicher, G. (1981) *Pokročilé cvičení z biochemie*, PřF UK, Praha.
  76. Hodek, P., Křížková, J., Frei, E., Singh, R., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2011) Impact of beta-naphthoflavone on genotoxicity of food-derived carcinogens. *Neuro Endocrinol. Lett.* **32** Suppl 1, 25–34.
  77. Shoda, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Toyoda, K., Uneyama, C., Takada, K., Hirose, M. (2000) Liver tumor-promoting effect of beta-naphthoflavone, a strong CYP 1A1/2 inducer, and the relationship between CYP 1A1/2 induction and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.* **28**, 540–47.
  78. Zhang, Q.-Y., Wikoff, J., Dunbar, D., Fasco, M., Kaminsky, L. (1997) Regulation of Cytochrome P4501A1 Expression in Rat Small Intestine. *Drug Metab. Dispos.* **25**, 21–26.
  79. Lubet, R.A., Connolly, G., Kouri, R.E., Nebert, D.W., Bigelow, S.W. (1983) Biological effects of the Sudan dyes: Role of the Ah cytosolic receptor. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 3053–58.



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>jméno a příjmení s adresou</b>	<b>číslo OP</b>	<b>datum vypůjčení</b>	<b>poznámka</b>